

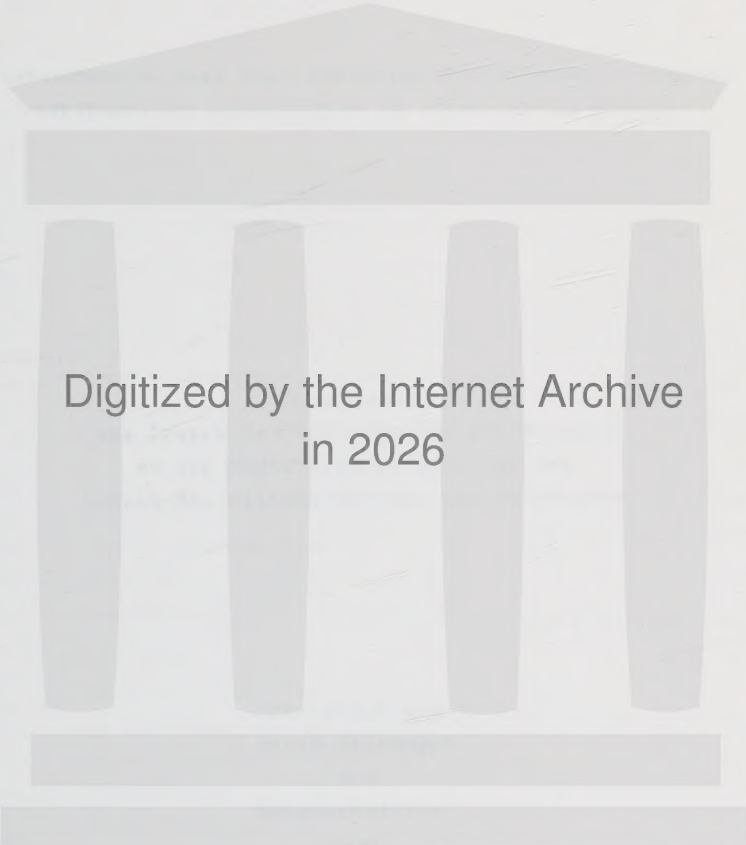
Untersuchungen
über die Leukotrien B₄-Synthese
in humanen neutrophilen Granulozyten
in vitro und ex vivo

Alois Sellmayer

Disbui. München

1987





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554619_0059

Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt der Universität München
Vorstand Prof. Dr. med. E. Buchborn

Untersuchungen über die Leukotrien B₄-Synthese in humanen
neutrophilen Granulozyten in vitro und ex vivo.*

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Alois Sellmayer
aus
Hohenschäftlarn
Jahr
1987

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der
Wilhelm-Sander-Stiftung

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. P.C. Weber
Prof. Dr. W. Forth

Mitberichterstatter: Prof. Dr. E. Buchborn
Prof. Dr. E. Gerlach

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.1987

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Stimulierbarkeit der LTB ₄ -Synthese in einem in vitro Modell	3
2.1. Theoretische Grundlagen	3
2.1.1. Modell neutrophiler Granulozyt	3
2.1.2. Chemie der Leukotriene	4
2.1.3. Biosynthese der Leukotriene	5
2.1.4. Funktion der Leukotriene	10
2.1.5. Charakterisierung der Stimuli	12
2.2. Methodik und Analytik	18
2.2.1. Gewinnung der PMNL	18
2.2.2. Markierung der Zellen mit ³ H-Arachidonsäure	19
2.2.3. Stimulation der LTB ₄ -Synthese	19
2.2.4. Aktivierung des Zymosan	20
2.2.5. Extraktion der Proben	21
2.2.6. Analyse der Proben	21
2.2.7. Phospholipase A ₂ -Ansatz	24
2.3. Ergebnisse	26
2.3.1. Gewinnung der PMNL	26
2.3.2. Markierung der Zellen mit ³ H-Arachidonsäure	26
2.3.3. Stimulation mit A 23187	31
2.3.4. Stimulation mit fMLP	35
2.3.5. Stimulation mit SCZ	37
2.4. Diskussion	45
2.4.1. Gewinnung der PMNL	45
2.4.2. Markierung der Zellen mit ³ H-Arachidonsäure	45
2.4.3. Stimulation mit A 23187	50

	Seite
2.4.4. Stimulation mit fMLP	52
2.4.5. Stimulation mit SCZ	55
2.4.6. Vergleich der 3 Stimuli	59
3. Stimulierbarkeit der LTB ₄ -Synthese bei Patienten mit pHPT	66
3.1. Theoretische Grundlagen	66
3.2. Auswahl der Patienten	67
3.3. Methodik	67
3.4. Ergebnisse	69
3.5. Diskussion	74
4. Zusammenfassung	82
5. Literaturverzeichnis	83

Abkürzungen

AA	= Arachidonsäure
A 23187	= Calcium-Ionophor A 23187
CaCl_2	= Calciumchlorid
CB	= Cytochalasin B
CHCl_3	= Chloroform
cpm	= counts per minute; Zählraten pro Minute
D(i)HETE	= Dihydroxy-Eikosatetraensäure; umfaßt LTB_4 und dessen 6-trans-Stereoisomere
fMLP	= formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
HCl	= Salzsäure
5-HETE	= 5-Hydroxy-Eikosatetraensäure
HPLC	= High Performance Liquid Chromatography
^3H -Substanz	= mit Tritium markierte, radioaktive Substanz
5-LO	= 5-lipoxygenase
LT ($\text{LTB}_4, \dots$)	= Leukotrien (Leukotrien $\text{B}_4, \dots$)
NL	= Neutral-Lipide
PBS	= Phosphate-Buffered-Saline; Phosphatpuffer
pHPT	= primärer Hyperparathyroidismus
PL	= Phospholipide
- PC	= Phosphatidylcholin
- PE	= Phosphatidylethanolamin
- PI	= Phosphatidylinositol
- PS	= Phosphatidylserin
PLA_2	= Phospholipase A_2
PMNL	= polymorphkerniger neutrophiler Granulozyt
PTE	= Parathyroidektomie
RIA	= Radio-Immuno-Assay
SCZ	= mit Serum aktiviertes Zymosan
TLC	= Thin-Layer-Chromatography; Dünnschichtchromatographie

1. Einleitung

1938 charakterisierten Feldberg und Kellaway (44) eine Substanz, die nach Behandlung von Meerschweinchenlungen mit Kobra-Gift in der Spülflüssigkeit auftrat und die am Jejunum des Meerschweinchens eine, im Vergleich zu Histamin langsamer einsetzende und länger andauernde Kontraktion auslöste. Wegen dieser Unterscheidung zu Histamin gaben 1940 Kellaway und Threthewie (74) der unbekannten Substanz den Namen "Slow Reacting Substance" (SRS). Zugleich konnten sie das Auftreten der SRS bei anaphylaktischen Reaktionen in Meerschweinchenlungen nachweisen. 1953 führte Brocklehurst (21) für diese bei immunologischen Reaktionen auftretende SRS den Namen "Slow Reacting Substance of Anaphylaxis" (SRS-A) ein. Es gelang ihm die SRS-A eindeutig von Histamin und anderen kontraktionsauslösenden Mediatoren allergischer Reaktionen abzugrenzen. In weiteren Untersuchungen wurde die SRS-A in der Lungenspülflüssigkeit von Asthmatikern nach Antigen-Exposition (22, 131) nachgewiesen und ihre bronchokonstriktorische Wirkung auf die isolierte Meerschweinchenlunge beschrieben (7).

Ein bedeutender Schritt zur Aufklärung der chemischen Struktur gelang Morris 1978 (95), als er die SRS-A durch Hochdruck-Chromatographie (HPLC) in mehrere Einzelsubstanzen auftrennen konnte. Bereits 1976 hatte Conroy (31) gezeigt, daß in menschlichen Leukozyten die SRS-A aus dem Präkursor Arachidonsäure gebildet wird. 1979 identifizierte Borgeat (15) als einen weiteren Arachidonsäuremetaboliten in neutrophilen Granulozyten eine Dihydroxy-Fettsäure, die er Leukotrien B_4 (LTB_4) nannte und deren Struktur er aufklären konnte. In weiteren Arbeiten wurde die Umsetzung der Arachidonsäure zu Lipiden beschrieben, die chromatographisch dem LTB_4 ähnlich sind und daher als Leukotrien A_4 (14), C_4 (97) und D_4 (5) bezeichnet wurden. Murphy (97) und Bach (5) konnten zeigen, daß die Leukotriene C_4 und D_4 Komponenten

der SRS-A sind. Zusammenfassend führten 1979 Samuelsson und Borgeat (127) die Nomenklatur der Leukotriene für LTB_4 und die Substanzen der SRS-A (bzw. der SRS) ein.

Neueste Untersuchungen über das Vorkommen, die Wirkungen und die Funktionen der Leukotriene weisen auf eine bedeutende Mediatorfunktion bei frühen immunologischen und bei entzündlich-proliferativen Vorgängen, sowie bei allergischen Reaktionen hin.

2. Stimulierbarkeit der LTB_4 -Synthese in einem in vitro Modell

2.1. Theoretische Grundlagen

2.1.1. Modell neutrophiler Granulozyt

Der neutrophile Granulozyt (PMNL) ist eine geeignete Zelle für Untersuchungen zur LTB_4 -Synthese. Er wird dem unspezifischen Akut-Phase-Abwehrsystem des Organismus zugeordnet. Seine Hauptaufgabe besteht in der Emigration zu und Abgrenzung von akut entzündeten Geweben und in der Erkennung und Bekämpfung invasiver Mikroorganismen. Im Blut haftet der PMNL entweder am Endothel oder zirkuliert, mit einer Lebensdauer von einem bis maximal vier Tagen (43). Auf bestimmte Reize ist er in der Lage die intakte Gefäßwand zu durchdringen (Diapedese). Zu einem Entzündungsherd gelangt er durch positive Chemotaxis - einer zur höheren Konzentration eines chemischen Reizes gerichteten Bewegung. Mikroorganismen eliminiert der Granulozyt durch die Bildung von Sauerstoffradikalen ($\hat{=}$ respiratory burst; zB O_2^- , H_2O_2 oder $OH^\cdot$), durch die Freisetzung lysosomaler Enzyme (zB Laktoferin, Myeloperoxidasen oder Lysozym) oder durch Phagozytose. Vorherige 'Opsonisation' des Fremdkörpers - das bedeutet eine Aktivierung der Fremdkörper-Oberfläche mit Immunglobulinen, Komplement-Faktoren oder anderen immunogenen Proteinen (zB C-reaktives Protein) - erhöht die Phagozytoseleistung der PMNL. Die Konzentrierung der phagozytierten toxischen Substanzen führt zum (lichtmikroskopischen) Verschwinden der Granulae (Degranulation). Dies kann auch ohne Phagozytose auftreten, wobei eine Freisetzung der Enzyme aus den Granulae in das extrazelluläre Medium erfolgt. (Für weitere Einzelheiten siehe 43, 89, 123, 132)

Um diese Abwehrfunktion erfüllen zu können, muß der PMNL die Fähigkeit besitzen, auf Entzündungsreize zu reagieren und immunologische Reaktionen durch Synthese und Freisetzung weiterer



Mediatoren zu steuern und zu modulieren. Eine solche Mediatorfunktion erfüllt das LTB_4 . Es wird vor allem in PMNL gebildet (64, 85). Die Bedeutung der Verknüpfung zwischen PMNL als primäre Quelle und LTB_4 wird durch die geringe Syntheserate anderer Arachidonsäuremetabolite in diesen Zellen betont: Die Leukotriene der SRS-A finden sich nach Stimulation nur in kleinsten Mengen (87, 158) und der Nachweis von Cyclooxygenase-Produkten beschränkt sich auf Spuren von Prostaglandinen. In eigenen Versuchen und bei Sun (148) wurden in hochgereinigten PMNL-Inkubationen keine, bei Walsh (155) und Miller (94) geringe Mengen Prostaglandine gefunden.

Neben diesen prädestinierenden physiologischen Eigenschaften liegt ein weiterer Vorteil der PMNL in ihrer relativ einfachen Gewinnung aus venösem Blut. Dabei sind sowohl hohe Zellzahlen für vergleichende Versuche, als auch mehrmalige Blutabnahmen bei denselben Spendern für Langzeitstudien möglich.

2.1.2. Chemie der Leukotriene

Der Begriff Leukotriene (LT) charakterisiert eine Gruppe von azyklischen Fettsäurederivaten, die 3 konjugierte Doppelbindungen und einen oder zwei Sauerstoffs substituenten enthalten. Die Präkursor sind höher ungesättigte Fettsäuren, in erster Linie Arachidonsäure ($C_{20:4}$; AA), die enzymatisch in die Leukotriene übergeführt werden. Obligat ist die Initiierung der LT-Synthese durch die 5-Lipoxygenase (5-LO), das Auftreten eines Epoxids (LTA) als Intermediärprodukt und dessen enzymatische Metabolisierung zu den Endprodukten (64, 127). Zur Unterscheidung der verschiedenen LT wurden diese mit den Buchstaben A bis F bezeichnet. Der Index nach den Buchstaben gibt die Zahl der Doppelbindungen im Molekül an (für Arachidonsäure-Derivate 4; 128). Der Name selbst leitet sich aus LEUKOzyten, den primär beschriebenen Quellen, und aus der Bezeichnung für 3 konjugierte Doppelbindungen TRIEN ab. Diese

Definition schließt auch Derivate anderer ungesättigter Fettsäuren, wie zB der Eikosatrien- oder der Eikosapentaensäure ein. Der Stoffwechselweg dieser Fettsäuren mit einem Gerüst aus 20 Kohlenstoff-Atomen wird zusammenfassend auch als "Eikosanoid-system" bezeichnet, wobei als Metabolite vor allem Prostaglandine und Leukotriene von Bedeutung sind (s. Abb. 1).

Chemisch sind die Leukotriene mit dem Präkursor Arachidonsäure folgendermaßen definiert (s. Abb. 2):

LTA ₄	5(S)-5,6-oxido-7,9-trans-11,14-cis-Eikosatetraensäure
LTB ₄	5(S),12(R)-dihydroxy-6-cis-8,10-trans-14-cis-Eikosatetraensäure
LTC ₄	5(S)-hydroxy,6(R)-S-gluthathionyl-7,9-trans-11,14-cis-Eikosatetraensäure
LTD ₄	5(S)-hydroxy,6(R)-S-cysteinyl-glycyl-7,9-trans-11,14-cis-Eikosatetraensäure
LTE ₄	5(S)-hydroxy,6(R)-S-cysteinyl-7,9-trans-11,14-cis-Eikosatetraensäure
LTFC ₄	5(S)-hydroxy,6(R)-S-cysteinyl-γ-glutamyl-7,9-trans-11,14-cis-Eikosatetraensäure

2.1.3. Biosynthese der Leukotriene

Die Präkursoren der Leukotriene, als bedeutendster die Arachidonsäure*, werden in der Regel mit der Nahrung aufgenommen. In den Zellen werden sie über eine Esterbindung vorwiegend an Phospholipide der Zellmembran, aber auch an Neutrallipide gebunden. Bei in vitro Versuchen kann dieser Vorgang mit radioaktiv markierten

* Im folgenden werden die Bezeichnungen der Zwischenprodukte und der Endprodukte auf den Präkursor Arachidonsäure bezogen.

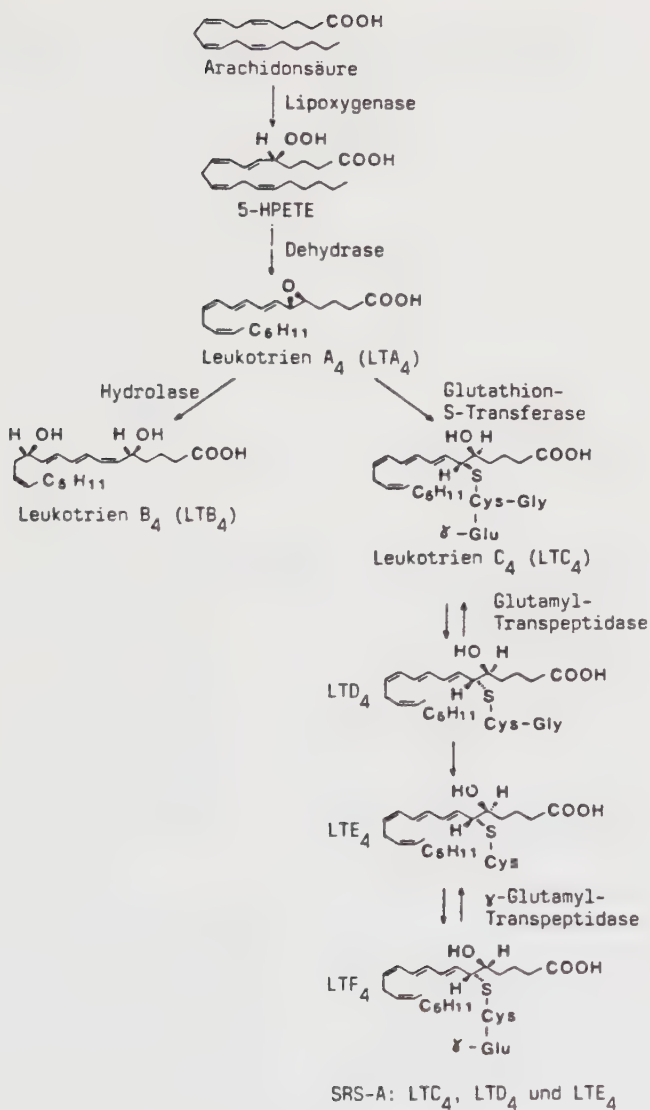


Abb. 2: Der 5-Lipoxygenaseweg mit Zwischenstufen (5-HPETE, LTA₄) und den Endprodukten Leukotrien B₄ und den Leukotrienen der SRS-A-Gruppe (nach 129).

Fettsäuren nachvollzogen werden. Die daraus resultierende Markierung des Eikosanoidsystems ermöglicht es durch den Nachweis geringster Umsatzraten der radioaktiven Fettsäuren Rückschlüsse über die Beeinflussung, wie Aktivierung, Hemmung oder Nebenschlüsse dieses Stoffwechselweges zu erhalten.

Auf geeignete Stimulation der Zellen wird die gebundene Fettsäure durch Phospholipasen - zB die Phospholipase A₂ (78) oder die Phospholipase C (68) und eine Diacyl-Glyceryl-Lipase (6) - oder durch eine Triacyl-Glyceryl-Lipase (68) freigesetzt. Die weitere Metabolisierung kann über 2 enzymatisch geregelte Wege erfolgen (s. Abb. 1):

- a) die Lipooxygenase leitet die Bildung der Leukotriene und der Monohydroxy-Fettsäuren ein, während
- b) die Cyclooxygenase zu den Prostaglandinen und Tromboxanen führt.

Die 5-LO, ein im Cytosol (70, 80) und in der Zellmembran (67, 102) nachgewiesenes, Calcium-abhängiges (69, 106) Enzym, bewirkt die Oxygenierung der Fettsäure an C₅ zu einer 5-Hydroperoxy-Eikosatetraensäure (5-HPETE; s. Abb. 2). Diese kann durch die cytosolische (80) LTA₄-Synthetase - eine Dehydrase - dehydratisiert werden. Es entsteht das äußerst instabile Epoxid LTA₄. Daneben wird die 5-HPETE durch Reduktasen zu 5-Hydroxy-Eikosatetraensäure (5-HETE), einer Monohydroxy-Fettsäure, reduziert. Sie stellt ein Endprodukt dar. Die Intermediärs substanz LTA₄ wird entweder durch 2 Enzymsysteme oder spontan metabolisiert (s. Abb. 2 und 3). Die LTA₄-Hydrolase bewirkt die enzymatische Hydrolyse an C₁₂ der Fettsäure. Es entsteht die Dihydroxy-Fettsäure LTB₄ mit den OH-Gruppen an C₅ und C₁₂ in (S)- bzw. in (R)-Stellung und einer Doppelbindung bei C₆ in cis-Stellung. Die spontane, nicht enzymatische Hydrolyse (s. Abb. 3) führt zu Stereoisomeren des LTB₄ mit den Konfigurationen 5(S),12(R)-6-trans-, bzw. 5(S),12(S)-6-trans- und zu 5,6-Dihydroxy-Eikosatetraensäure. LTB₄ wird durch ω -Oxidation zu 5,12,20-Trihydroxy-Eikosatetraensäure (20-OH-LTB₄) und zu

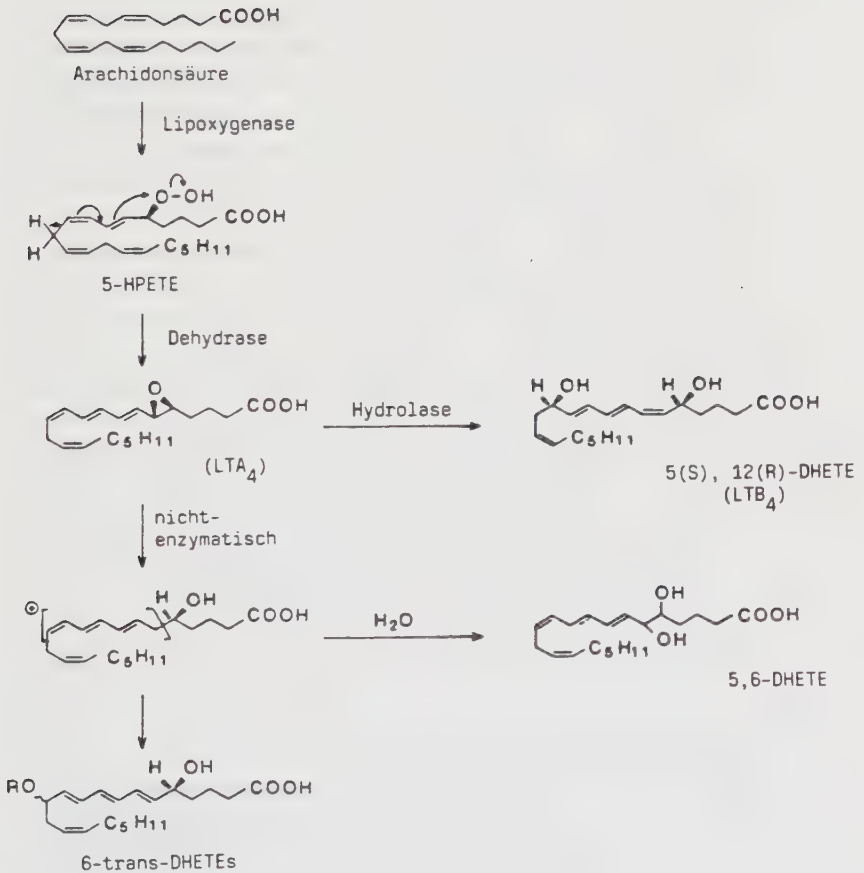


Abb. 3: Schritte der LTB₄-Synthese und der Entstehung seiner nicht-enzymatisch gebildeten Stereoisomere (nach 129).

1,20-Dicarboxy-5,12-Dihydroxy-Eikosatetraensäure (20-COOH-LTB_4) inaktiviert (63, 136).

Der zweite enzymatische Weg führt von LTA_4 zu den Leukotrienen der SRS-A-Gruppe: LTC_4 , LTD_4 und LTE_4 (s. Abb. 2). LTC_4 entsteht aus LTA_4 durch Bindung eines Moleküls Gluthathion an C_6 mittels einer Gluthathion-S-Transferase. Aus LTC_4 spaltet die membrangebundene (80) γ -Glutamyltranspeptidase die Aminosäure Glutaminsäure ab. Das Produkt dieser Reaktion ist LTD_4 . Durch Abspaltung des Glycin durch eine Amino-Peptidase wird LTE_4 gebildet. Zudem beschrieb Anderson (2) eine Substanz als LTF_4 , die durch Anlagerung einer γ -Glutaminsäure an das Cystein des LTE_4 entsteht. Der weitere Abbau aller Leukotriene der SRS-A-Gruppe erfolgt durch Peroxidation zu Sulfoxiden und Sulfonen und zu 6-trans-Stereoisomeren des LTB_4 (52, 82).

Die Bildung von Leukotrienen konnte in erster Linie in Leukozyten nachgewiesen werden. Dabei synthetisieren menschliche neutrophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen vor allem LTB_4 ; Mastzellen, basophile und eosinophile Granulozyten die Leukotriene der SRS-A-Gruppe (64, 78, 85). Lipooxygenase-Aktivität in Leukozyten und Thrombozyten (78) resultiert darüberhinaus in der Synthese weiterer Mono- und Dihydroxy-Fettsäuren. Diese besitzen aber gegenüber den Leukotrienen eine sehr viel geringere physiologische Wirkung (61, 90, 105).

2.1.4. Funktion der Leukotriene

Untersuchungen über die Wirkungen der Leukotriene ergaben eindeutige Unterschiede zwischen LTB_4 und der SRS-A-Gruppe. LTB_4 wirkt in erster Linie auf neutrophile Granulozyten (PMNL). Es stellt für diese Zellen den stärksten, bisher bekannten chemotaktischen Reiz dar (33, 51, 104) und steigert ihre

Chemokinese (46). Darüber hinaus fördert es die PMNL-Aggregation (34, 46, 120) und deren Adhäsion an das Endothel (49) und an Nylon-Membranen (104). Es führt auch zu einer mäßigen Degranulation der PMNL (11, 51, 135) und zur Bildung von Superoxid-Anionen (135). LTB_4 bindet an PMNL über spezifische Rezeptoren (55, 79) und bewirkt konsekutiv eine Erhöhung des freien intrazellulären Calciums (86, 160). Diese bei in vitro Versuchen festgestellten Wirkungen zeigen sich bereits bei Konzentrationen im nanomolaren Bereich (33).

In vitro konnten weitere immunomodulatorische Eigenschaften des LTB_4 nachgewiesen werden: Die Proliferation und Proteinsyntheseleistung von T-Lymphozyten wird vermindert (107), ebenso die polyklonale Immunglobulin-Synthese von B-Lymphozyten (3). Dagegen wird die Aktivität zytotoxischer Zellen gesteigert (121) und die Ausbildung der mit OKT-8 assoziierten Suppressor-Zell-Aktivität induziert (3). In vivo Versuche zeigten, daß LTB_4 in der menschlichen Haut chemotaktisch auf PMNL wirkt (20, 23) und daß bei Meerschweinchen ein erhöhter broncho-pulmonaler Widerstand (62) und ein monophasischer Blutdruckanstieg (137) nach Aerosol- bzw iv-Applikation auszulösen war.

Die biologische Aktivität der ω -Oxidationsprodukte 20-OH- LTB_4 und 20-COOH- LTB_4 , sowie der LTB_4 -Stereoisomere ist in Bezug auf Auslösung der Chemotaxis (33, 71), der Aggregation (120, 135), der Degranulation (135) und der Superoxid-Anion-Bildung (135) bei PMNL geringer, als die des LTB_4 , wie in vitro Versuche belegten. Die Wirkungen der anderen Mono- und Dihydroxy-Fettsäuren sind ebenfalls um ein Vielfaches geringer (51, 64).

Die Leukotriene der SRS-A-Gruppe wirken in erster Linie an der glatten Muskulatur kontraktionsauslösend, so zB am Magen-Darm-Trakt (54), an der Gallenblase (163), an den Koronarien (75, 150) oder an den Bronchien (35). Diese Kontraktionen sind weitaus stärker, als die auf Histamin, Bradykinin oder Prostaglandin E_2 (50). Am menschlichen Bronchialgewebe war sie ungefähr 1000 mal stärker, als die durch Histamin induzierte

Bronchokonstriktion (35). Die Aerosolapplikation der SRS-A bei freiwilligen Probanden resultierte in einer gesteigerten Schleimsekretion der oberen Luftwege (85). Eine Mediatorfunktion beim allergischen Asthma bronchiale gilt als sehr wahrscheinlich (36). In der menschlichen Haut war nach lokaler LTC₄-Gabe in vivo eine Zunahme der Durchblutung und der Vasopermeabilität feststellbar (9, 141). In vitro Versuche mit menschlichen Endothelzellen ergaben eine Induktion der Prostaglandin I₂-Synthese durch die SRS-A (32, 113). In Tierversuchen konnten weitere Einflüsse auf das kardiovaskuläre und bronchopulmonale System sowohl nach systemischer, als auch nach Aerosol-Applikation beobachtet werden (83, 111; 84, 96).

In diesen Untersuchungen über die biologische Aktivität der Leukotriene zeichnet sich für LTB₄ eine bedeutende Mediatorfunktion bei entzündlich-proliferativen und frühen immunologischen Prozessen und für die SRS-A-Gruppe bei Erkrankungen des allergischen Formenkreises ab. In Übereinstimmung hiermit konnten hohe Leukotrien-Spiegel bei verschiedenen Krankheiten in menschlichen Körperflüssigkeiten und Gewebeproben nachgewiesen werden. Die Tabelle 1 gibt eine Zusammenstellung der Krankheiten, des Untersuchungsmaterials und der Art der gefundenen Leukotriene wieder.

2.1.5. Charakterisierung der Stimuli

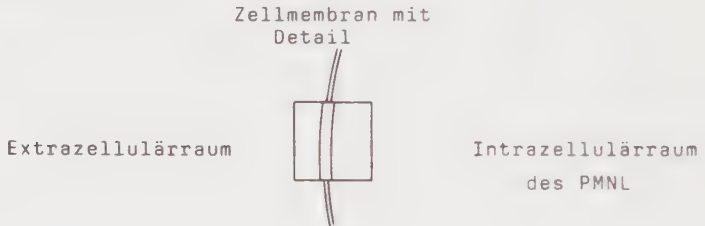
Zur Stimulierung der LTB₄-Synthese in PMNL wurden 3 chemisch und immunologisch unterschiedlich determinierte Substanzen verwendet. Eine Aktivierung des Eikosanoidsystems konnte von Borgeat (13) zuerst für das Calcium-Ionophor A 23187 gezeigt werden, das konsekutiv als Standardstimulus Anwendung fand. Seine physiologische Wirkung beruht auf einem ausgeprägten Einstrom extrazellulären Calciums in die Zelle (s. Abb. 4a). Durch Komplexbildung mit extrazellulären Kationen (vor allem Calcium) im Verhältnis 2:1 (38, 112) erreicht das Ionophor Ladungsneutralität und kann durch die

Tabelle 1: Nachweis von Leukotrienen bei Erkrankungen des Menschen

Erkrankungen	Untersuchungsmaterial	Leukotriene	Literatur
allergischer Formenkreis			
Rhinokonjunktivitis	Tränen, Nasenlavage	LTC ₄ - E ₄	59
Asthma bronchiale	Sputum	LTC ₄ + D ₄	53
allergische Hauterkrankungen	Ödemflüssigkeit der Haut	LTB ₄ + C ₄	53
chronisch entzündliche Prozesse			
pcP und Spondylarthritis	Synovialflüssigkeit	LTB ₄	77
Gicht	Synovialflüssigkeit	LTB ₄	117
Mb Crohn	Dünndarm-Mucosa	LTB ₄	53
andere Erkrankungen			
ARDS	Lungenödemflüssigkeit	LTB ₄ + D ₄	93
cystische Pankreasfibrose	Sputum	LTB ₄ + D ₄	53
Psoriasis	Epidermis, Ödemfl.d.Haut	LTB ₄ + C ₄ + D ₄	19
Hypoxie des Neugeborenen	Lungenlavage	LTC ₄ + D ₄	145

Abb. 4: Die, nach bisherigen Erkenntnissen postulierten Wirkmechanismen der einzelnen Stimuli:

Schemaerklärung:



a) für A 23187:

2 Moleküle A 23187 und ein Ca^{++} -Ion bilden einen elektrisch neutralen, membranpermeablen Komplex, der intrazellulär dissoziiert und zu einer Erhöhung der Ca^{++} -Konzentration führt. Dadurch wird das Eikosanoidsystem aktiviert (ES_a). A 23187 gelangt nach Bindung mit intrazellulären Kationen zurück in den Extrazellulärraum.

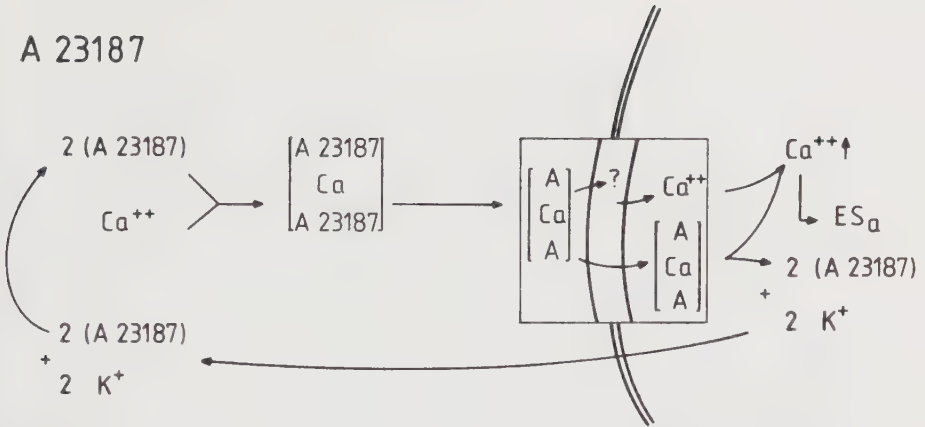
b) für fMLP:

Das Tripeptid bindet über einen spezifischen Rezeptor an die Zellmembran, bewirkt dadurch über bisher ungeklärte Mechanismen die Freisetzung membrangebundener Ca^{++} -Ionen und über die erhöhte Ca^{++} -Konzentration eine Aktivierung des Eikosanoidsystems.

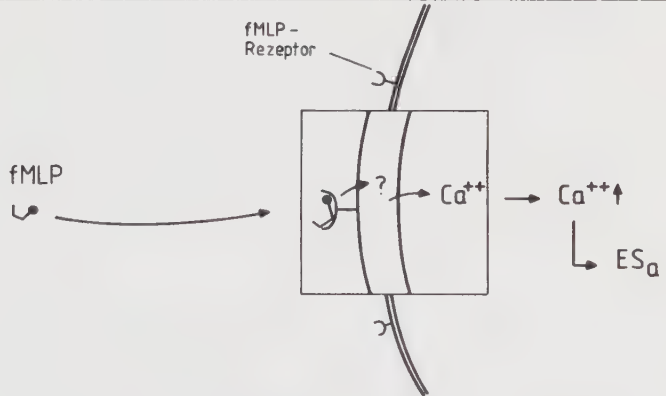
c) für SCZ:

In Serum aktiviertes Zymosan kann über verschiedene Proteine, zB C_{5a} oder C_{3b} , direkt an Membranrezeptoren gebunden werden und über die Freisetzung membrangebundener Ca^{++} -Ionen eine Aktivierung des Eikosanoidsystems bewirken. Nicht aktiviertes Zymosan und SCZ werden von PMNL phagozytiert, wobei kein Zusammenhang zwischen Phagozytose und Aktivierung des Eikosanoidsystems zu bestehen scheint.

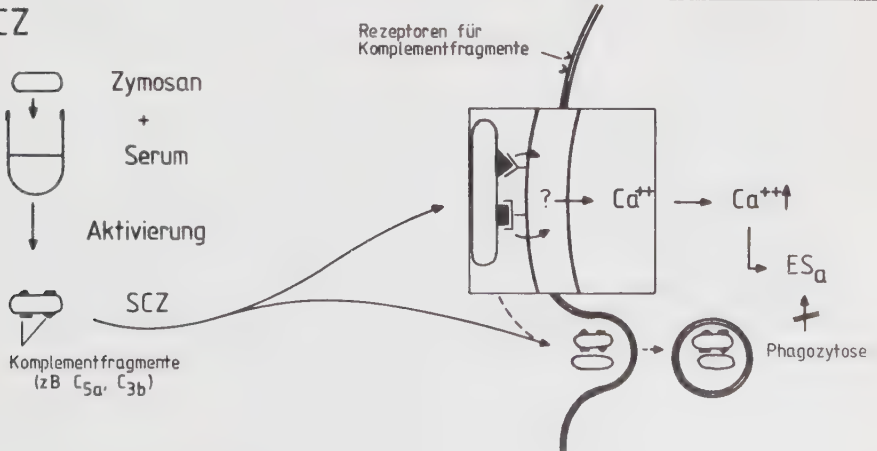
a) A 23187



b) fMLP



c) SCZ



Zellmembran permeieren. Nach Dissoziation im intrazellulären Raum kommt es dort zur Erhöhung der Ca^{++} -Konzentration. Dies führt zur Aktivierung Ca^{++} -abhängiger Enzyme, wie zB der 5-L0 (69, 106) oder von Phospholipasen (16). Durch erneute Komplexbildung mit monovalenten intrazellulären Kationen wird das Ionophor wieder membranpermeabel und gelangt in den extrazellulären Raum zurück (38).

Bei PMNL führt die Inkubation mit A 23187 zu einem Ca^{++} - Na^{+} -Einstrom (98), zur Freisetzung membrangebundener Arachidonsäure (156) und zu deren Metabolisierung zu Monohydroxy-Fettsäuren und zu Leukotrienen (31, 146). Außerdem bewirkt es eine Aggregation der PMNL (73), die Bildung von Superoxid-Anionen (122, 130) und die Freisetzung lysosomaler Enzyme (139, 164).

Der zweite Stimulus ist das chemotaktische Tripeptid "formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin" (fMLP) in Verbindung mit dem Pilzgift Cytochalasin B (CB). fMLP ist in seiner Sequenz und Wirkung auf Zellen bakteriellen Endotoxinen sehr ähnlich (18). Es wird über spezifische Rezeptoren an die Zellmembran der PMNL gebunden (47, 101) und führt dann zur Freisetzung von membrangebundenem Ca^{++} (98, 99) und zu einem Einstrom extrazellulärer Kationen (98; s. Abb. 4b). Der Phospholipid-Umsatz ist gesteigert, wobei der Abbau von Phosphatidylinositol im Vordergrund steht (30, 41, 134) und Arachidonsäure freigesetzt und metabolisiert wird (65). fMLP übt eine relativ starke chemotaktische Wirkung auf PMNL aus (108, 140). Es bewirkt bei PMNL darüber hinaus die Bildung von Superoxid-Anionen (18, 39), die Freisetzung lysosomaler Enzyme (41, 108) und die Adhäsion an Endothelien (151).

Das Pilzgift Cytochalasin B (aus *Helminthosporium dematioides*) hat in erster Linie eine membranstabilisierende Wirkung. Es hemmt Membrandeformierungen (1) über eine Reduktion der Kontraktilität von Mikrofilamenten (1, 159). Ebenso werden Phagozytose und Pinozytose (37, 143), wie auch Zellbewegungen und die Cytokinese (25) inhibiert. Seine Funktion als "Verstärker" der erwünschten zellulären Reaktionen auf fMLP soll in einer "Gleichschaltung" der PMNL liegen (133), wie zB für die Superoxid-Anion-Bildung bereits

gezeigt wurde (18).

Als dritter Stimulus diente Zymosan A, ein Polysaccharid aus Hefepilzen, das mit Serum aktiviert wurde (SCZ für 'serum coated zymosan'). Ohne Serumaktivierung stellt es für PMNL nur einen Stimulus zur Phagozytose dar (157). Eine Aktivierung der Eikosanoidbildung erfolgt erst nach dem Vorgang der Opsonisation. Zymosan aktiviert im Serum den Alternativweg ($\equiv$ Properdinweg) des Komplementsystems (57, 162), wodurch sich Fragmente des Komplementsystems daran binden (48; s. Abb. 4c). Vor allem die Fragmente C_{3b} und C_{5a} scheinen für die Interaktion mit PMNL von Bedeutung zu sein (45, 48, 57, 162). Sowohl für C_{3b} (76), als auch für C_{5a} (26) wurden spezifische Rezeptoren auf der PMNL-Membran nachgewiesen, deren Besetzung zu einem Ca^{++} -Anstieg im Cytosol führt (17, 144) und somit Ca^{++} -abhängige Enzyme aktiviert. SCZ stimuliert ebenfalls die Phagozytoseleistung der PMNL (76), aber es bewirkt zudem die Freisetzung von Arachidonsäure (156), deren Metabolisierung durch die 5-LO (27, 81, 117) und die Abgabe der Produkte aus der Zelle (161).

2.2. Methodik und Analytik

2.2.1. Gewinnung der PMNL

Freiwilligen, gesunden Probanden wurde venöses Blut abgenommen und mit 10 IE Heparin (Fa. Braun, Melsungen) pro ml Blut ungerinnbar gemacht. Die Abtrennung des plättchenreichen Plasmas erfolgte mit einer Zentrifugation bei 150 x g für 15 min. Nach Abtragung des plättchenreichen Plasmas wurde das restliche Blut mit plättchenarmem Plasma (10 % der Ausgangsblutmenge) verdünnt. Zur Trennung der zellulären Bestandteile des Blutes schloß sich eine Dichtegradienten-Zentrifugation mit Percoll (Fa. Pharmacia, Freiburg) an (nach 66). Dafür wurde isotoner Percoll mit 0,9 %iger NaCl-Lösung auf zwei Dichtestufen von 55 % und 74 % verdünnt. Nach Unterschichtung des 55 %igen Percolls mit 74 %igem wurde das verdünnte Restblut überschichtet (Volumenanteile je 1:1:1) und bei 360 x g für 20 min zentrifugiert. Es resultierte eine Auftrennung in Erythrozyten, 74 %igem Percoll mit PMNL, 55 %igem Percoll mit Lymphozyten und Monozyten und einer obersten Schicht mit Plasma. Nach Abpipettieren der PMNL-Schicht erfolgte zur Entfernung des Percolls eine Verdünnung mit 5,5 mM Glucose-Phosphatpuffer [PBS-G; zusammengesetzt aus dem Phosphatpuffer PM 16 (Fa. Serva, Heidelberg) und einer 5 %igen Glucose-Lösung (Fa. Braun, Melsungen)] und eine Zentrifugation bei 190 x g für 10 min. Die restlichen Erythrozyten wurden darauf durch Zugabe von eiskaltem Wasser für 15 sec lysiert. Nach Isotonisierung mit 20 %iger NaCl-Lösung folgte eine Zentrifugation bei 120 x g für 10 min. Zuletzt schloß sich eine Zentrifugation mit einer Lösung aus PBS-G und 15 mg% Kälber-Albumin (BSA, frei von essentiellen Fettsäuren; Fa. Sigma, München) bei 50 x g für 10 min an. Danach wurden die Zellen in einem definierten Volumen PBS-G resuspendiert und in einer Neubauerkammer, nach Verdünnung mit Thrombophob (Fa. Nordmark, Hamburg), gezählt. Eine Vitalitätsprüfung mit Trypan-Blau folgte. Die Reinheit der PMNL betrug ca

98 % mit einer Plättchen-Kontamination von ungefähr 1 auf 100 PMNL. Die Vitalität der Zellen lag bei mehr als 98 %. Die Effektivität der PMNL-Separation entspricht damit anderen Veröffentlichungen (66, 119).

2.2.2. Markierung der Zellen mit ^3H -Arachidonsäure

Zur Markierung der PMNL mit tritierter Arachidonsäure (^3H -AA) wurden diese aus der oben aufgeführten Suspension auf eine Konzentration von 4×10^6 pro ml Medium verdünnt. Das Medium bestand aus PBS mit 15 mg% BSA und 5,5 mM Glucose. Zur Inkorporation der AA folgte eine Inkubation mit 200 pmol ^3H -AA (spezifische Radioaktivität 93 Ci/mmol; Fa. Amersham, Großbritannien) bei 37°C im Wasserbad. Danach wurden die Zellen bei $50 \times g$ für 10 min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abpipetiert. Nach Resuspension der PMNL in 1 ml PBS-G ($\approx 2 \times 10^7$ PMNL) ergab die Vitalitätsprüfung mit Trypan-Blau mehr als 90 % intakte PMNL.

2.2.3. Stimulation der LTB_4 -Synthese

Nicht radioaktiv markierte PMNL (1×10^7 pro ml) oder radioaktiv markierte PMNL (2×10^7 pro ml) wurden für 10 min bei 37°C im Wasserbad vorinkubiert. Die Hauptinkubation schloß sich durch Zugabe der einzelnen Stimuli an. Dabei wurden, wie im folgenden Schema dargelegt, die Ca^{++} -Konzentration durch Zugabe von CaCl_2 (Fa. Merck, Darmstadt) auf 0,8 mM eingestellt und die angegebenen Stimuli hinzugegeben (alle Fa. Sigma, München):

1) für A 23187:

Zugabe des CaCl_2 ; Einstellen der A 23187-Konzentration auf $10 \mu\text{M}$ (A 23187 gelöst in Ethanol, Endkonzentration 0,2 %)

2) für fMLP:

weitere Vorinkubation für 5 min mit $5 \mu\text{g}$ Cytochalasin B;
Zugabe des CaCl_2 ; Einstellen der fMLP-Konzentration auf $10 \mu\text{M}$ (beide Substanzen gelöst in DMSO, Endkonzentration 0,6 %)

3) für SCZ:

Zugabe des CaCl_2 ; Zugabe von 16,7 mg SCZ (gelöst in PBS).

Die Hauptinkubation wurde durch rasches Abkühlen der Proben in Eiswasser und sofortiger, hoher Zentrifugation beendet. Die Aufbewahrung des zellfreien Überstandes erfolgte bei -20°C bis zur Extraktion der 5-LO-Produkte. Bei radioaktiv markierten Proben wurde die verbliebene Zellmasse in 0,9 %iger NaCl-Lösung aufgeschwemmt und ebenfalls bei -20°C aufbewahrt.

2.2.4. Aktivierung des Zymosan

10 ml antikoagulationsfreies Vollblut wurden mit 250 μl Trasylol (≈ 5000 Kallikrein-Inhibitor-Einheiten; Fa. Bayer, Leverkusen) vermischt und zur Autokoagulation für 60 min bei 37°C im Wasserbad aufbewahrt. Darauf erfolgte unverzüglich eine Zentrifugation bei $800 \times g$ für 10 min. Das Serum wurde abpipettiert, erneut mit 250 μl Trasylol vermischt und bei 4°C aufbewahrt. Die Aktivierung des Zymosan erfolgte ca. 45 min vor Gebrauch. 50 mg Zymosan A wurden mit 2 ml Serum und 1 ml PBS vermischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach zweimaliger Zentrifugation (je $800 \times g$ für 5 min bei 4°C) wurden die Zymosanpartikel in 2 ml PBS resuspendiert und bis zur Inkubation bei 4°C aufbewahrt.

2.2.5. Extraktion der Proben

Für Dünnschicht-Chromatographie wurden die Proben nach der Methode von Bligh und Dyer (10) extrahiert. Dafür wurde die wäßrige Phase mit Ethanol (1:1; Vol:Vol) verdünnt, mit 10 %iger Ameisensäure auf einen pH-Wert von 3,0 angesäuert und mit 2 ml Chloroform (CHCl_3) durch kräftiges Schütteln vermischt. Nach einer Zentrifugation bei $800 \times g$ für 10 min zur rascheren Phasentrennung wurde die CHCl_3 -Phase abpipettiert und die wäßrige Phase erneut mit 2 ml CHCl_3 extrahiert. Im Rotationsverdampfer folgte darauf die Trocknung der Proben, anschließend, nach Resuspension in CHCl_3 , das Auftragen auf Dünnschichtplatten.

Für die Analyse der Proben mittels HPLC fand eine modifizierte Kartusche-Extraktion nach Jakschik (70) Anwendung. Die Proben wurden mit HCl auf einen pH-Wert von 3,0 angesäuert und mit 100 ng Prostaglandin B_2 (Fa. Serva, Heidelberg) als Bezugssubstanz für die Effektivität der Extraktion vermischt (13, 92). Die Kartusche (SEP-PAK C_{18} ; Fa. Waters, Milford, USA) wurde mit je 20 ml Methanol und Wasser aktiviert und danach die Probe eingebracht. Nach Reinigung der Kartusche von polaren Substanzen mit 2×5 ml Wasser wurden die Lipide mit Methanol eluiert und im Rotationsverdampfer getrocknet. Bis zur Analyse blieben die getrockneten Proben bei -20°C tiefgekühlt.

2.2.6. Analyse der Proben

Zur Analyse radioaktiver Proben fanden 2 Dünnschicht-Chromatographie-Systeme (TLC) Anwendung. Die 5-LO-Produkte wurden auf mit Kieselgel 60 F_{254} beschichtete DC-Plastikfolien (Fa. Merck, Darmstadt) aufgetragen und mit einem Laufmittel aus CHCl_3 : Methanol: Essigsäure (96 %): H_2O (Volumenanteile: 90:8:1:0,8) getrennt (nach 153). Die Auftrennung der Phospholipide erfolgte über mit Kieselgel N-HR beschichtete DC-Glasplatten (Fa. Machery & Nagel,

Düren) und einem Laufmittel aus CHCl_3 :Methanol:Essigsäure (96 %): H_2O (Volumenanteile: 75:45:12:3) (nach 138). Die Cochromatographie radioaktiver Standardsubstanzen ermöglichte die Identifikation der einzelnen Substanzen durch einen Linear-Scanner (Fa. Berthold, München). Mit den angegebenen Chromatographie-Verfahren konnte jeweils die eindeutige Trennung der einzelnen Substanzen erreicht werden (s. Abb. 7, 9). Nach Abkratzen der jeweiligen Substanzbereiche schloß sich die Quantifizierung der Produkte durch Zählung im β -Flüssigszintillationszähler (Fa. Beckmann, Fullerton, USA) an.

Nicht-radioaktive Proben wurden durch Hochdruckchromatographie (reversed-phase HPLC; Pumpe der Fa. Waters, Milford, USA) und daran gekoppelter UV-Spektrometrie (UV-Spektrometer der Fa. Tegiementa, Rotkreuz, Schweiz) bei einer Wellenlänge von 280 nm analysiert. Die Chromatographiesäule (Nucleosil 5 C_{18}) wurde von Machery & Nagel, Düren, bezogen. Das Laufmittel bestand aus Methanol: H_2O :Essigsäure (96 %) (Volumenanteile: 700:300:0,1; nach 147). Durch Beschallung mit Ultraschall wurden Gasblasen entfernt und darauf der pH-Wert auf 5,7 mit 25 %iger Ammonium-Lösung eingestellt. Die getrockneten, tiefgekühlten Proben wurden in einer geringen Menge Laufmittel resuspendiert und bei einer Flußrate von 1 ml/min analysiert (s. Abb. 5). Die Quantifizierung erfolgte durch Bezug der Leukotrien-Werte auf den PGB_2 -Standard. Diese allgemein anerkannte Methode (13, 92) ist anwendbar, da sowohl die Verluste durch die Extraktion, als auch die chromatographischen Eigenschaften der beiden Substanzen annähernd identisch sind. PGB_2 kann aber nicht von Zellen gebildet werden.

In nicht-radioaktiven Proben wurde die LTB_4 -Menge zusätzlich mit einem Radio-Immuno-Assay (RIA) unter Verwendung eines Antikörpers der Fa. Amersham, Großbritannien bestimmt. Der RIA-Puffer, ein 50 mM Tris-HCl-Puffer mit 0,1 % Gelatine, wurde durch Lösung von 6,06 g Tris-(hydroxymethyl)-methylamin (Fa. Sigma, München) und 1,0 g Gelatine (Fa. Sigma, München) in 1000 ml destilliertem Wasser erstellt. Die Einstellung des pH-Wertes auf 8,6 erfolgte mit einer HCl-Lösung. Zu 100 μl Puffer wurden gleiche Volumina der Proben, eines ^3H - LTB_4 -Standards (Fa. Amersham,



Abb. 5: HPLC-Auftrennung einer mit 10 μM A 23187 stimulierten Probe (1×10^7 PMNL), nach Kartusche-Extraktion. E: Extinktionseinheiten; PGB₂: Prostaglandin B₂; I und II: 5,12-Dihydroxy-6-trans-Stereoisomere des LTB₄; III: LTB₄; IV: 20-OH-LTB₄

Großbritannien) und des Antikörpers pipettiert. Nach guter Durchmischung inkubierten die Proben für 18 Stunden bei 4° C. Abkühlung und Equilibrieren im Eiswasser beendeten die Inkubation. Der Zugabe von 200 µl "Aktivkohle" (mit Dextran verbundene Aktivkohle) folgte eine Zentrifugation bei 200 x g und 4° C für 15 min. Die Proben blieben auf Eiswasser gekühlt, während der Überstand in Szintillationsgefäße überführt wurde. Die Zählung im β -Flüssigszintillationszähler schloß sich an. Durch Bezug der Zählraten auf eine im gleichen Ansatz erstellte Eichkurve mit definierten LTB₄-Mengen wurden die Proben quantitativ ausgewertet.

Bei der Quantifizierung ergaben sich Abweichungen der LTB₄-Werte zwischen RIA und HPLC. Im Mittel wurden die Werte bei HPLC-Analyse 2,5 mal höher bestimmt, als im RIA. Da sich die RIA-Daten jeweils aus, mit LTB₄-Standards definierten Eichkurven errechneten, dürfte deren Genauigkeit größer sein, als die der HPLC-Auswertung. Dafür sprechen zudem, daß bei HPLC 1) die Bestimmung der absoluten LTB₄-Menge über die Wiederfindung einer anderen Substanz erfolgte, wobei 2) eine eindeutige Festlegung der Grenzen der zu bestimmenden Flächen nicht immer möglich war, was 3) zu einer weniger exakten Bestimmung der gefundenen Substanzmenge führen mußte. Da es sich hierbei um systematische Fehler handelt, ist ein Vergleich der HPLC-Daten untereinander durchaus zulässig. Beim Vergleich mit Daten, die durch andere Methoden, zB durch RIA, bestimmt wurden, muß diese Differenz hingegen beachtet werden.

2.2.7. Phospholipase A₂-Ansatz

Die zellulären Restbestandteile wurden bei einigen radioaktiv markierten Proben mit Phospholipase A₂ (PLA₂; Fa. Sigma, München) behandelt. Der erste Schritt bestand in einer Zerstörung der PMNL mit Ultraschall, einer Proteindenaturierung und einer Auflösung der Membranen durch Vermischen der resuspendierten Zellmasse mit

Methanol und CHCl_3 (Volumenanteile: 1:1:1). Die wäßrige Phase wurde unter Stickstoff abgedampft und die Zellmasse in 10 mM Tris-Puffer (pH 7,5) und Ethanol (Volumenanteile: 50:1) resuspendiert. Die Inkubation mit 1 μg PLA_2 folgte nach Einstellen der Ca^{++} -Konzentration auf 10 mM (mit CaCl_2) bei 37° C für 30 min im Wasserbad. Die Zugabe von 2 Teilen CHCl_3 beendete die Inkubation. Extraktion und Analyse der Lipide folgten, wie oben für radioaktive Proben beschrieben wurde (s. Abschnitt 2.2.5. und 2.2.6.).

2.3. Ergebnisse

2.3.1. Gewinnung der PMNL

Die oben beschriebene Methode der Zelltrennung erbrachte eine Reinheit der PMNL von ca. 98 %, mit einer Plättchen-Kontamination von ca. 1 Thrombozyt auf 100 PMNL. Die Vitalität der Zellen lag, nach Testung mit Trypan-Blau, bei mehr als 98 %. Diese Daten ergeben im Vergleich zu Dextran- und/oder Ficoll-Sedimentations-Präparationen eine mindestens gleich hohe Effektivität.

2.3.2. Markierung der Zellen mit ^3H -Arachidonsäure

Anhand der Prüfkriterien, gute Zellvitalität und fehlender Nachweis einer Aktivierung der Eikosanoidbildung nach der radioaktiven Markierung, gelang es hierfür die Kombination aus geeignetem Medium, ausreichender Fettsäure-Konzentration und adäquater Dauer zu optimieren.

Als bestes Medium erwies sich ein Gemisch aus dem Phosphatpuffer PM 16 mit 5,5 mM Glucose und 15 mg% fettfreiem Kälber-Albumin. Versuche mit Nährmedien - zB. RPMI 1640 - oder physiologischer NaCl-Lösung, auch unter Zusatz verschiedener Stoffe - zB MgCl_2 , Gluthathion oder Hydrocortison - erbrachten schlechtere Resultate. Die Änderung der Albuminkonzentration zeigte für höhere Konzentrationen eine geringere Aufnahme der Arachidonsäure (AA), verminderte Freisetzung von ^3H -LTB₄ und zugleich eine gesteigerte Umsetzung der AA während der Markierung. Den gleichen Effekt hatte eine zu hohe AA-Konzentration. Bereits bei 3,6 μM AA war eindeutig sowohl die Bildung von LTB₄, als auch von 5-HETE nachweisbar. Erst unterhalb einer AA-Konzentration von 72 nM wurde kein LTB₄ mehr gebildet. Die 5-HETE trat sogar bis zu einer AA-Konzentration von 18 nM in Spuren auf. Um nach Stimulation noch eine ausreichende Menge tritiiertter 5-LO-Produkte

zu erhalten, wurde die AA-Konzentration auf 36 nM eingestellt.

Die Aufnahme der AA in zelluläre Phospholipide erreichte bereits nach 30 min 65 % der eingesetzten Radioaktivität und nach 60 min stellte sich mit 69 ± 8 % ein Plateau dar (Abb. 6). Die ^3H -AA verteilte sich zu 46 ± 10 % auf Phosphatidyl-inositol (PI), zu 16 ± 3 % auf Phosphatidylcholin (PC), zu 9 ± 2 % auf Phosphatidylethanolamin (PE) und zu 29 ± 5 % auf neutrale Lipide (Abb. 7 und 8). Bei keinem Versuch konnte in der Phosphatidylserin- (PS) Fraktion Radioaktivität nachgewiesen werden.

Nach Beendigung der Markierung mit einer langsamen Zentrifugation zeigten die Zellen eine Vitalität von 90 bis 95 % bei Prüfung mit Trypan-Blau.

Die Analyse des abpipettierten Mediums ergab, daß freie ^3H -AA nur noch in Spuren vorhanden war. Es konnte weder über TLC ^3H -LTB₄, noch über HPLC unmarkiertes LTB₄ gefunden werden. ^3H -S-HETE blieb stets in geringsten Mengen nachweisbar. Die Effektivität des Fettsäureeinbaus in zelluläre Lipide lag im Mittel bei 95 %.

Dieser Wert ermittelt sich - wie in anderen Literaturangaben üblich (8, 146) - durch Bestimmung der restlichen freien Radioaktivität im Überstand nach der Markierung im Verhältnis zu der insgesamt wiedergefundenen Radioaktivität. In Diskrepanz dazu steht die Bestimmung der Effektivität durch den Bezug der in zellulären Lipiden wiedergefundenen Radioaktivität auf die theoretisch eingesetzte Radioaktivität. Dabei ergab sich lediglich ein Wert von 20 %.

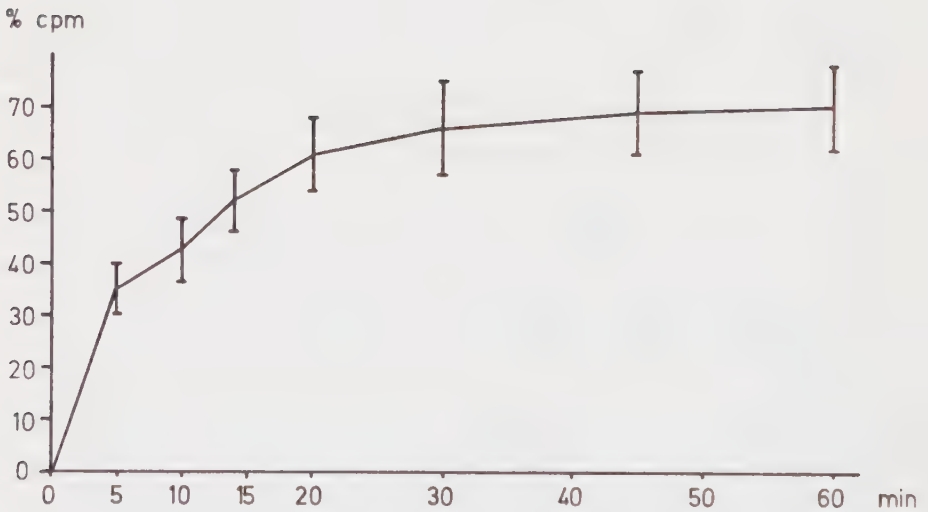


Abb. 6: Zeitkurve des Einbaus der ^3H -Arachidonsäure in zelluläre Phospholipide. Darstellung der markierten Phospholipide in Prozent der in der Gesamtprobe vorhandenen Radioaktivität (in cpm).

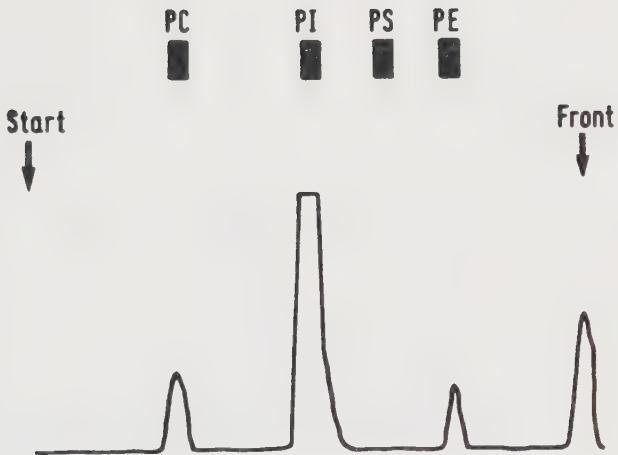


Abb. 7: TLC-Auftrennung radioaktiv markierter Phospholipide aus nicht stimulierten PMNL.
■: Darstellung cochromatographierter Standardsubstanzen.

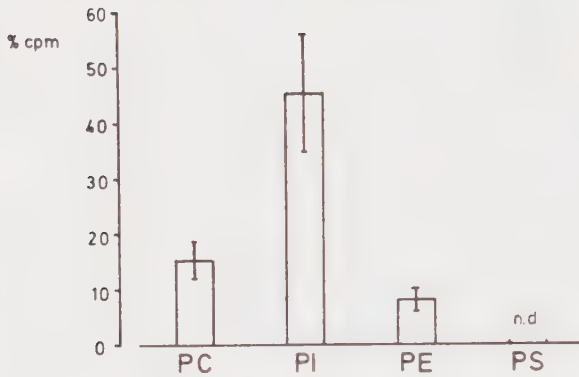


Abb. 8: Verteilung der ^3H -Arachidonsäure auf die einzelnen Phospholipid-Subklassen. Darstellung der markierten Subklassen in Prozent der in der Gesamtprobe vorhandenen Radioaktivität (in cpm). PC: Phosphatidylcholin; PI: Phosphatidylinositol; PE: Phosphatidylethanolamin; PS: Phosphatidylserin; n.d.: nicht detektierbar.

2.3.3. Stimulation mit A 23187

Die Standardinkubationsbedingungen wurden mit dem Calcium-Ionophor A 23187 festgelegt. Dabei ergaben sich gut quantifizierbare und reproduzierbare Resultate für eine Zellmenge von 1×10^7 PMNL pro ml und einer Konzentration des Ionophors von $10 \mu\text{M}$. Die größte Menge LTB_4 ergab sich nach 2 min mit $40,7 \pm 15,4 \text{ ng } \text{LTB}_4$ (RIA) bzw $120 \pm 43,8 \text{ ng}$ (HPLC). Bei 5 min Stimulation blieb die Abnahme auf $38,3 \pm 15,5 \text{ ng}$ (RIA) bzw $106 \pm 37,4 \text{ ng}$ (HPLC) gering, während bei 10 min überwiegend eine deutliche Reduzierung des LTB_4 auf $32,4 \pm 7,8$ (RIA) bzw $83 \pm 40,3 \text{ ng}$ festzustellen war (Tab. 2, Abb. 15). In einigen wenigen Proben fand sich bei 10 min ein höherer Wert, als bei 2 min.

Mit der Länge der Inkubationsdauer änderte sich das Verhältnis von LTB_4 zu seinen beiden 6-trans-Stereoisomeren (HPLC-Bestimmung). Bei 2 min überwog LTB_4 mit 50 % der gefundenen Dihydroxy-Metabolite, bei 5 min war es auf 40 % und bei 10 min gar auf 33 % reduziert. Gegensinnig dazu erhöhten sich die Anteile der Stereoisomere.

In radioaktiv markierten Proben war die freigesetzte Menge an ^3H -DiHETE mit $35932 \pm 5472 \text{ cpm}$ bei 5 min maximal, gegenüber $23712 \pm 7691 \text{ cpm}$ bei 2 min. Bei 10 min war eine Abnahme auf $33106 \pm 10002 \text{ cpm}$ feststellbar (Tab. 2). Da diese Proben über TLC analysiert wurden (Abb. 9), kann nur die absolute Menge radioaktiver Dihydroxy-Fettsäuren (^3H -DiHETE) angegeben werden. Eine Auftrennung des LTB_4 von seinen Stereoisomeren ist dabei nicht möglich. Das ω -Oxidationsprodukt des LTB_4 , das 20-OH- LTB_4 , trat mit einer zeitlichen Verzögerung zum LTB_4 auf und erreichte sein Maximum erst bei 10 min. Parallel dazu nahmen auch die 5-HETE und die freie AA bis zu 10 min kontinuierlich zu (Tab. 2, Abb. 10). Die Menge der insgesamt freigesetzten ^3H -AA und ihrer Metabolite stieg beständig von 48673 cpm bei 2 min über 72935 cpm bei 5 min auf 91852 cpm bei 10 min an.

Tabelle 2: Ergebnisse der Stimulationen mit A 23187

I) LTB ₄ aus nicht radioaktiv markierten PMNL (ng LTB ₄ pro 1 x 10 ⁷ PMNL)					
Methode	2 min HI	5 min HI	10 min HI	20 min HI	
HPLC	120 ± 43,8	106 ± 37,4	83 ± 40,3		n.b.
RIA	40,7 ± 15,4	38,3 ± 15,5	32,4 ± 7,8		21,2 ± 5,3
II) ³ H-AA-Metabolite aus radioaktiv markierten PMNL (cpm pro 2 x 10 ⁷ PMNL)					
Substanz	2 min HI	5 min HI	10 min HI		
DiHETE	23712 ± 7691	35932 ± 5472	33106 ± 10002		
20-OH-LTB ₄	3393 ± 725	9338 ± 2581	20677 ± 5220		
5-HETE	15184 ± 1021	16779 ± 3770	24595 ± 3126		
AA	6384 ± 4099	10886 ± 4603	13474 ± 6451		
gesamt	48673	72935	91852		

HI: Hauptinkubation; n.b.: nicht bestimmt

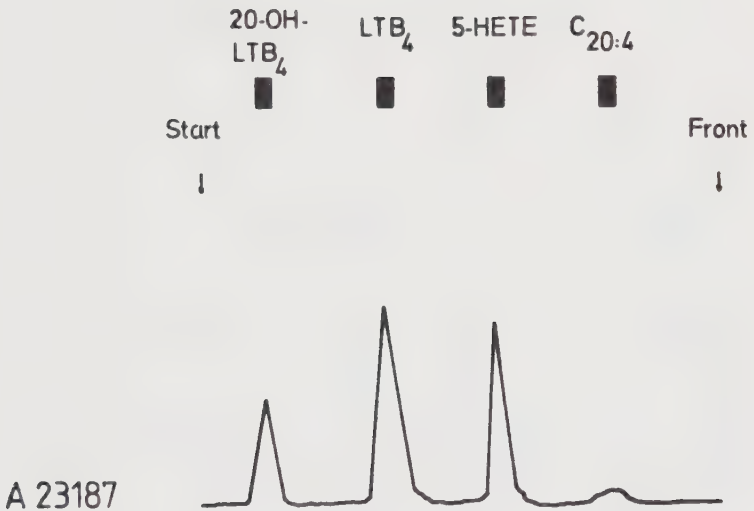


Abb. 9: TLC-Auftrennung radioaktiver 5-L0-Produkte nach Stimulation mit 10 μ M A 23187.
■: Darstellung cochromatographierter Standardsubstanzen.

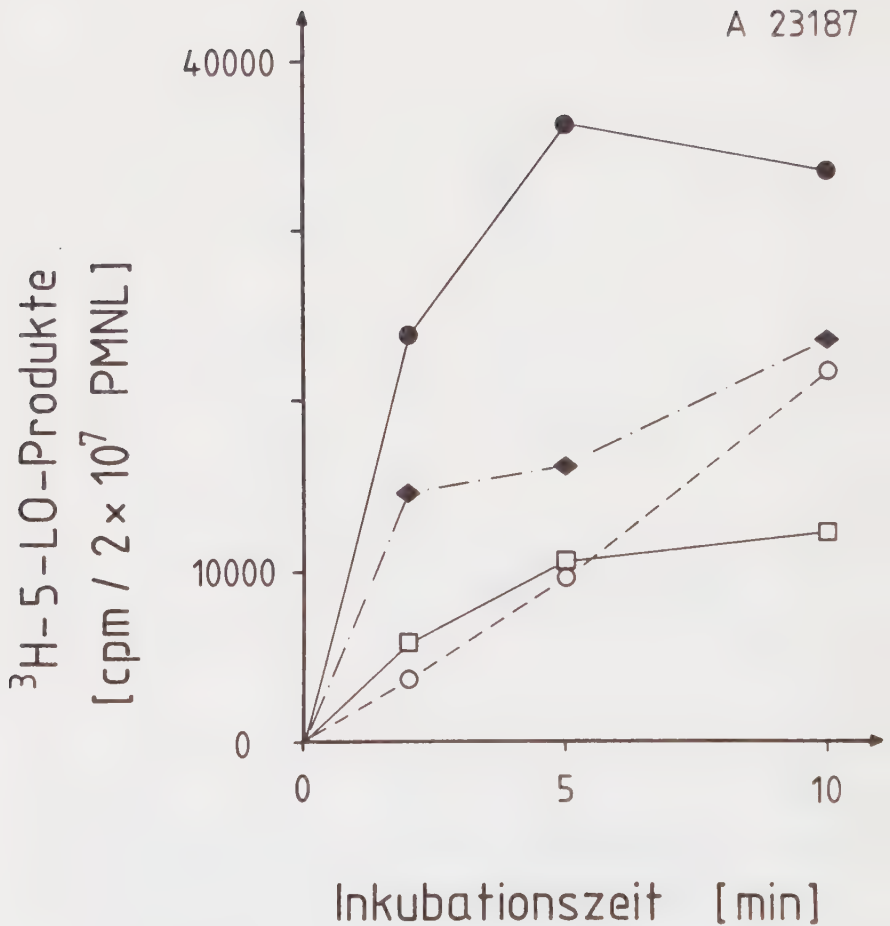


Abb. 10: Freisetzung und Metabolisierung der ^3H -AA aus den radioaktiv markierten PMNL (2×10^7) nach Stimulation mit $10 \mu\text{M}$ A 23187. Dargestellt sind die Mittelwerte (in cpm) für DHETE (●), 20-OH-LTB₄ (○), 5-HETE (◆) und freie AA (□) aus 4 getrennten Versuchen.

Bei allen Proben unterlag die absolute Menge freigesetzter 5-L0-Produkte einer großen interindividuellen Differenz. So ergab sich für den Wert bei 2 min bei HPLC-Analyse der Proben eine mittlere LTB_4 -Synthese von 120 ng, wobei der Minimalwert bei 59 ng und der Maximalwert bei 218 ng lagen.

Die Analyse der Phospholipide zeigte eine Abnahme des Gehalts an Radioaktivität in PI um 17,9 % und in PC um 4,4 %. Für PE war eine Zunahme um 2,2 % feststellbar. PS enthielt auch nach Stimulation keine Radioaktivität. In den Neutral-Lipiden stieg der Anteil um 18,1 %. Die Prozentangaben der Veränderungen in den Lipidklassen beziehen sich immer auf die Gesamtzählraten der zellulären Lipide. Die obigen Werte gelten jeweils für eine Inkubationsdauer von 5 min. Bei längeren Inkubationen konnte keine erhebliche Verschiebung mehr beobachtet werden.

Die Inkubation zellulärer Lipide mit Phospholipase A_2 resultierte bei Proben, die vorher mit A 23187 stimuliert worden waren, in einer Freisetzung von 3H -5-HETE und 3H -AA. Im Vergleich zu unstimulierten Proben war die freie 3H -5-HETE doppelt so hoch, während die freie 3H -AA sich auf die Hälfte verringerte. Ohne PLA_2 waren weder freie 3H -5-HETE, noch freie 3H -AA vorhanden.

2.3.4. Stimulation mit fMLP

Ausgehend von der gleichen Zellmenge wie bei den Versuchen mit A 23187 erfolgte im Konzentrationsbereich zwischen 1 und 10 μM fMLP eine annähernd gleich starke Stimulation der LTB_4 -Synthese. In Übereinstimmung mit der Mehrzahl der Literaturangaben (28, 60, 71, 94) wurde wegen der zuverlässigeren Handhabung die Konzentration von 10 μM fMLP bevorzugt. Durch Vorinkubation der Zellen mit 5 μg Cytochalasin B konnte die LTB_4 -Synthese um ca 30 % gesteigert und eine gute Reproduzierbarkeit erreicht werden (Abb. 11).



Abb. 11: TLC-Auftrennung radioaktiver 5-LO-Produkte nach Stimulation mit 10 μ M fMLP, nach Vorinkubation mit 5 μ g Cytochalasin B, mit 10 μ M fMLP allein oder mit 5 μ g Cytochalasin B allein.

■: Darstellung cochromatographierter Standardsubstanzen.

In nicht markierten Zellen war die maximale LTB_4 -Synthese bereits nach 0,5 bis 1 min mit $4,0 \pm 0,9$, bzw $3,9 \pm 1,5$ ng nachweisbar. Bei 2 min ergab sich eine Reduktion auf $2,8 \pm 1,2$ ng, bei 10 min gar auf $1,1 \pm 0,6$ ng (RIA) (Tab. 3, Abb. 15).

In den radioaktiv markierten Proben trat die maximale DiHETE-Synthese erneut später auf. Sie lag bei 1 min bei 7904 ± 699 cpm ^3H -DiHETE, stieg bei 5 min auf 12008 ± 2706 cpm und fiel bei 10 min auf 4408 ± 1398 cpm. Das 20-OH- LTB_4 erhöhte sich mit Verzögerung zum LTB_4 , hatte aber dennoch bei 5 min mit 11832 ± 2465 cpm ein Maximum und war bei 10 min auf 4292 ± 1102 cpm reduziert. Die Menge der 5-HETE schwankte in den ersten 5 min um 5000 cpm und fiel bei 10 min auf 3254 ± 893 cpm ab. Einen ähnlichen Zeitverlauf zeigte auch die freie AA. Zwischen 1 und 5 min war sie bei 5500 cpm, bei 10 min nur noch bei 2400 cpm (Abb. 12). Die Gesamtmenge der frei- und umgesetzten AA hatte bei 5 min mit 34051 cpm im Überstand ein Maximum und nahm bei 10 min um über 50 % auf 14373 cpm ab.

Die Analyse der zellulären Lipide ergab eine deutliche Verminderung der Radioaktivität in den Phospholipiden, nämlich um 10,3 % in PI und um 4,7 % in PC. In PE ließ sich eine Zunahme um 3,8 % feststellen. In einigen Proben konnten nach Stimulation Spuren von Radioaktivität in PS nachgewiesen werden. Die Markierung der Neutral-Lipide war im Mittel um 10,2 % erhöht. Die Angaben stellen die Werte für 5 min dar. Die Änderungen bei 10 min waren im Vergleich dazu unbedeutend.

2.3.5. Stimulation mit SCZ

Das Polysaccharid Zymosan A muß durch eine geeignete Präparationsmethode (s 2.2.4.) aktiviert werden, um in PMNL die Synthese und Freisetzung von LTB_4 zu bewirken. Wichtigster Schritt ist dabei die Inkubation mit homologem Serum, bei der eine Reduzierung des freien C_5 um ca 50 % gemessen werden konnte. Dies steht in

Tabelle 3: Ergebnisse der Stimulationen mit fMLP

I) LTB_4 aus nicht radioaktiv markierten PMNL (ng LTB_4 pro 1×10^7 PMNL)

Methode	30 sec HI	1 min HI	2 min HI	5 min HI	10 min HI
RIA	$4,0 \pm 0,9$	$3,9 \pm 1,5$	$2,8 \pm 1,2$	$2,4 \pm 1,2$	$1,1 \pm 0,6$

II) ^3H -AA-Metabolite aus radioaktiv markierten PMNL (cpm pro 2×10^7 PMNL)

Substanz	1 min HI	2 min HI	5 min HI	10 min HI
DiHETE	7904 ± 699	10397 ± 2128	12008 ± 2706	4408 ± 1398
20-OH- LTB_4	2639 ± 87	6960 ± 1334	11832 ± 2465	4292 ± 1102
5-HETE	5168 ± 479	4945 ± 1627	5104 ± 1117	3254 ± 893
AA	4670 ± 168	6250 ± 504	5107 ± 1008	2419 ± 1310
gesamt	20381	28552	34051	14373

HI: Hauptinkubation

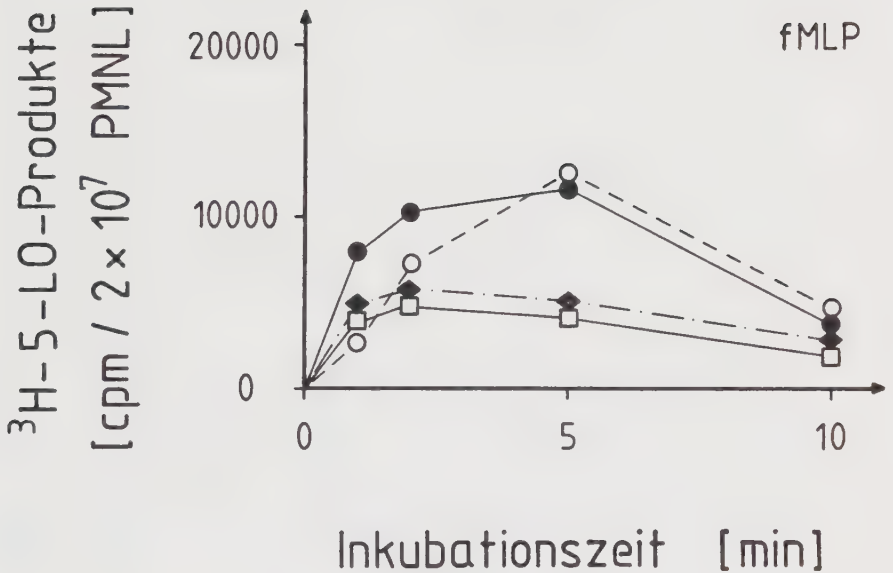


Abb. 12: Freisetzung und Metabolisierung der ^3H -AA aus den radioaktiv markierten PMNL (2×10^7) nach Stimulation mit $10 \mu\text{M}$ fMLP. Dargestellt sind die Mittelwerte (in cpm) für DHETE (●), 20-OH-LTB₄ (○), 5-HETE (◆) und freie AA (□) aus 4 getrennten Versuchen.

Übereinstimmung mit dem unter 2.1.5. diskutierten Wirkmechanismus. Der stimulatorische Effekt des Zymosan wurde durch die Einhaltung der Aktivierungszeit und der Aufbewahrungstemperatur, sowie durch die Zugabe des Proteinaseinhibitors Aprotinin (Trasylol) verbessert. Inkubationen der PMNL mit nicht aktiviertem Zymosan oder mit Trasylol allein ließen keine Stimulation der Eikosanoidbildung erkennen (Abb. 13).

Die Stimulation der LTB_4 -Synthese war mit 11,7 mg SCZ am stärksten. Bei geringeren Mengen war sie deutlich vermindert, z.B. bei 5,8 mg SCZ auf 63 %. Maximale LTB_4 - bzw. 3H -DiHETE-Spiegel ergaben sich sowohl für nicht radioaktiv, als auch für radioaktiv markierte Proben nach einer Inkubationszeit von 20 min. Dabei lag über diese Zeit ein nur mäßiger Anstieg des LTB_4 , bzw. der DiHETE vor. In nicht markierten Proben wurden bei 5 min $1,2 \pm 0,5$ ng, bei 10 min $1,6 \pm 0,9$ ng, bei 20 min $1,9 \pm 1,0$ ng und bei 30 min $1,3 \pm 0,7$ ng LTB_4 gefunden (RIA) (Tab. 4, Abb. 15). Ein ebenso flacher Kurvenverlauf zeigte sich bei den radioaktiv markierten Proben für die 3H -DiHETE mit 4499 ± 3405 cpm bei 5 min, 10731 ± 2158 cpm bei 10 min, 10883 ± 2736 cpm bei 20 min und 6962 ± 3496 cpm bei 30 min (Abb. 14). Fast parallel dazu verlief die Kurve für das 20-OH- LTB_4 , das ebenfalls bei 20 min mit 5017 ± 3625 cpm sein Maximum erreichte.

Quantitativ deutlich übertroffen wurde die DiHETE jedoch von der 5-HETE, mit 15216 ± 9315 cpm bei 5 min, 23670 ± 2871 cpm bei 10 min, 24499 ± 3074 cpm bei 20 min und 12934 ± 2059 cpm bei 30 min. Den weitaus größten Teil freigesetzter radioaktiver Substanzen stellte aber nicht metabolisierte 3H -AA dar (Abb. 13, 14). Sie erreichte bei 5 min 97978 ± 17606 cpm, stieg bis 20 min auf 117936 ± 7056 cpm und fiel bei 30 min auf 55003 ± 7694 cpm. Die Gesamtmenge der freigesetzten und metabolisierten AA war bei 20 min mit 158335 cpm maximal und verringerte sich bei 30 min auf 78640 cpm.

Die zellulären Lipide zeigten eine Abnahme der Radioaktivität

Tabelle 4: Ergebnisse der Stimulationen mit SCZ

I) LTB ₄ aus nicht radioaktiv markierten PMNL (ng LTB ₄ pro 1 x 10 ⁷ PMNL)					
Methode	5 min HI	10 min HI	20 min HI	30 min HI	
RIA	1,2 ± 0,5	1,6 ± 0,9	1,9 ± 1,0	1,3 ± 0,7	
II) ³ H-AA-Metabolite aus radioaktiv markierten PMNL (cpm pro 2 x 10 ⁷ PMNL)					
Substanz	5 min HI	10 min HI	20 min HI	30 min HI	
DiHETE	4499 ± 3405	10731 ± 2158	10883 ± 2736	6962 ± 3496	
20-OH-LTB ₄	1479 ± 522	4756 ± 812	5017 ± 3625	3741 ± 2987	
5-HETE	15216 ± 9315	23670 ± 2871	24499 ± 3074	12934 ± 2059	
AA	97978 ± 17606	110995 ± 5074	117936 ± 7056	55003 ± 7694	
gesamt	119172	150152	158335	78640	

HI: Hauptinkubation

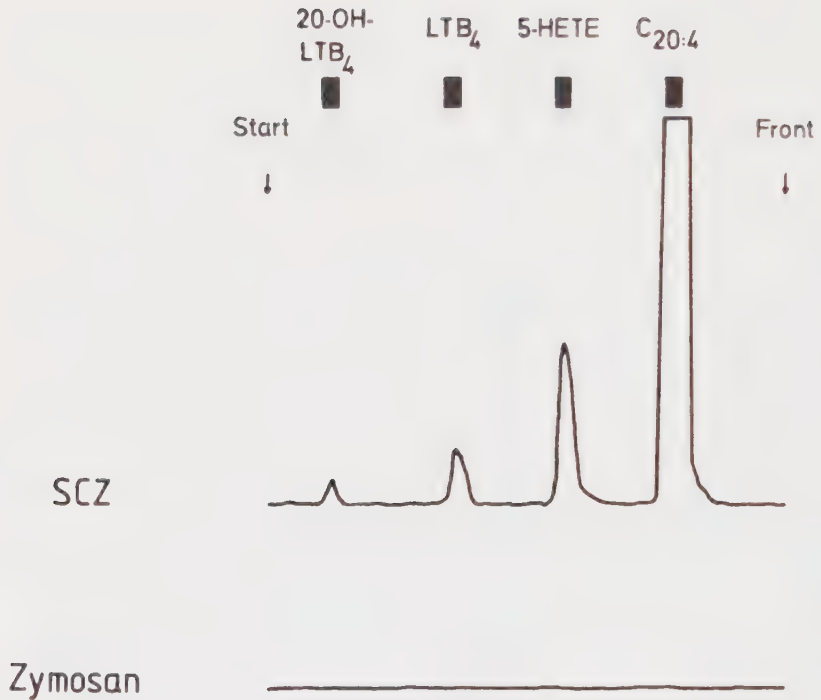


Abb. 13: TLC-Auftrennung radioaktiver 5-LO-Produkte nach Stimulation mit 16,7 mg SCZ und mit 16,7 mg nicht aktiviertem Zymosan.

■: Darstellung cochromatographierter Standardsubstanzen.

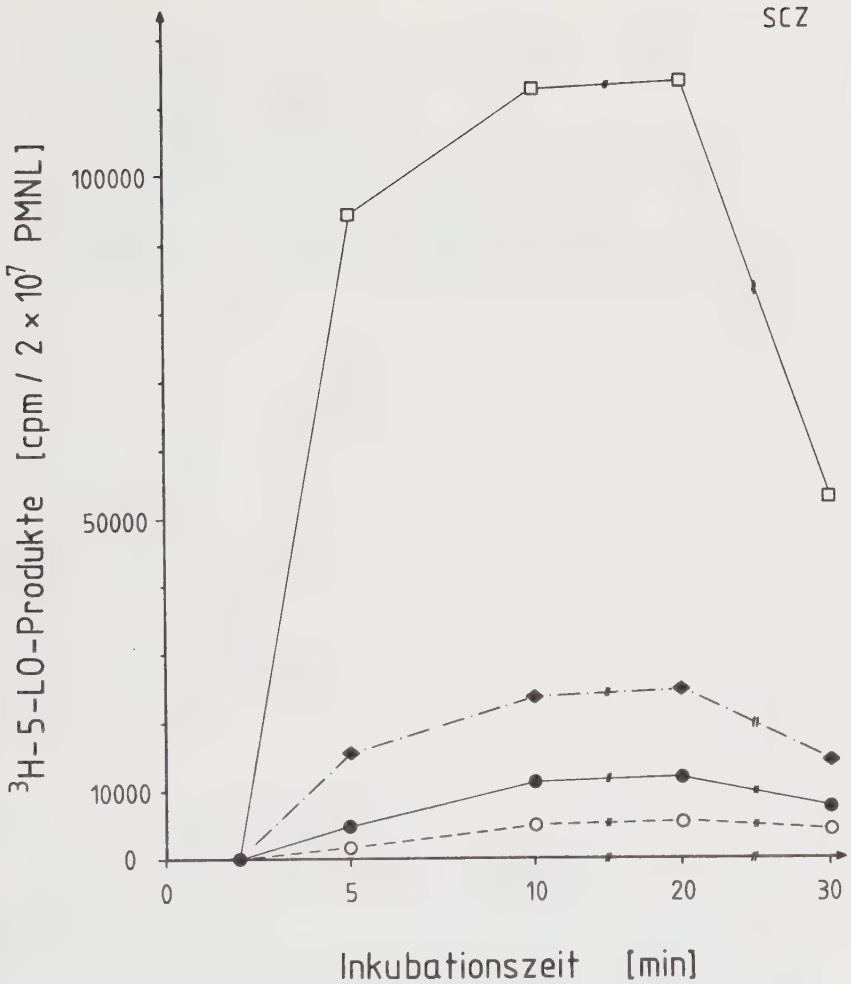


Abb. 14: Freisetzung und Metabolisierung der ^3H -AA aus den radioaktiv markierten PMNL (2×10^7) nach Stimulation mit 16,7 mg SCZ. Dargestellt sind die Mittelwerte (in cpm) für DHETE (●), 20-OH-LTB₄ (○), 5-HETE (◆) und freie AA (□) aus 4 getrennten Versuchen.

in den Phospholipiden. Bei 20 min Inkubationsdauer betrug diese für PI 12,3 % und für PC 0,5 %. In PE und den Neutral-Lipiden war dagegen eine Zunahme um 4,9 % bzw. 3,8 % feststellbar. Bei 30 min Inkubationsdauer fiel eine Umverteilung der Radioaktivität auf: in PI, PC und PE stieg sie wiederum um 5,9 %, 2,1 % bzw. 1,6 %, während in den Neutral-Lipiden eine Verminderung um 7,5 % vorhanden war. In PS war bei beiden Zeitpunkten keine radioaktive Fettsäure nachweisbar.

2.4. Diskussion

2.4.1. Gewinnung der PMNL

Mit der modifizierten Methode nach Hjorth (66) ließen sich hochgereinigte und in der Vitalität kaum beeinträchtigte PMNL-Fractionen separieren. Die geringe Kontamination mit Lymphozyten, Monozyten, Thrombozyten oder Erythrozyten wird nur von zweistufigen Präparationen erreicht. Diese erheblich länger dauernden (60 min vs 20 min) Methoden beruhen auf einer Sedimentation der Zellen mit Dextran (27, 124) oder mit Methylcellulose (28) und einer Dichtegradienten-Zentrifugation mit Ficoll-Hypaque. Der wesentliche Vorteil der Dichtegradienten-Zentrifugation mit Percoll liegt in der Kürze der Methode, wodurch eine zu große Schädigung der empfindlichen PMNL vermieden wird. Andere Methoden weisen entweder eine höhere Kontamination der PMNL, zB alleinige Dextran-Sedimentation (66), oder sehr lange Separationszeiten auf, zB Citrat-Phosphat-Dextrose-Trennung mit über 24 Stunden (27). Die weiteren Schritte, wie Lyse der Erythrozyten oder Reinigung der PMNL-Fraktion mit Pufferlösungen sind auch bei den anderen Präparationen notwendig.

2.4.2. Markierung der Zellen mit ^3H -Arachidonsäure

Die Markierung physiologischer Lipidstoffwechselwege mit radioaktiven Fettsäuren darf die Vitalität und Funktion der PMNL möglichst wenig beeinträchtigen. Während der zellulären Aufnahme der angebotenen Präkursoren muß eine ungewollte und unkontrollierte Aktivierung der interessierenden Stoffwechselwege vermieden werden. Bedeutende Parameter sind daher die Fettsäure-Konzentration, die Dauer der radioaktiven Markierung und das Medium.

Die verwendete Fettsäure-Konzentration von 36 nM steht im Gegensatz zu Literaturangaben, wo Konzentrationen von 0,5 μM (109) bis zu 1 bis 3 μM (8, 12, 146, 152) Anwendung fanden. Die Gefahr der Autostimulation dürfte jedoch mit der Höhe der AA-Konzentration steigen. So konnte von Volpi (154) bereits ab einer AA-Konzentration von 0,1 μM der Einstrom extrazellulären Calciums in PMNL - entsprechend dem 1. Schritt zellulärer Stimulationsmechanismen - nachgewiesen werden. Ergänzend hierzu ließ sich in eigenen Vorversuchen eine eindeutige Stimulation der LTB_4 - und 5-HETE-Synthese für höhere AA-Konzentrationen (zB 3,6 μM) zeigen. Ob eine Zellaktivierung und Umsetzung der AA bei den oben zitierten Arbeiten während des Markierens stattfand, geht nicht aus ihnen hervor. Nur Stenson (146) gibt an, bei 1 μM AA keine 5-LO-Produkte gefunden zu haben. Dies ergibt eine Diskrepanz zu eigenen Beobachtungen, bei denen selbst mit den sehr niedrigen AA-Konzentrationen (18 nM) die Bildung der 5-HETE während des Markierens nie ganz vermieden werden konnte. Dabei dürfte der alleinige Nachweis der 5-HETE, ohne gleichzeitige LTB_4 -Freisetzung, kein Indikator für eine schwerwiegende Aktivierung der PMNL sein. Diese Annahme stützen die weitaus geringere physiologische Aktivität der 5-HETE und ihre Stellung im Stoffwechsel als Endprodukt des "Reduktionsshunts" für 5-HPETE. LTB_4 hingegen führt bereits in kleinsten Konzentrationen zu einer erheblichen Zellaktivierung (33). Sein Auftreten während des Markierens könnte somit die Stimulierbarkeit des Eikosanoidsystems unkontrollierbar beeinflussen. Daher sollte eine möglichst geringe Einflußnahme auf die PMNL durch das Einhalten einer niedrigen AA-Konzentration beachtet werden.

Die weitere Zusammensetzung des Mediums soll die Homöostase der PMNL gewährleisten. Der physiologische pH-Wert, die Osmolarität und der Elektrolytgehalt werden durch einen, in einer annähernd isotonischen, isotonen Elektrolytlösung gelösten Phosphatpuffer konstant gehalten. Die Zugabe von Glucose in normoglykämischer

Konzentration (5,5 mM) soll die Zelle mit Energie versorgen. So dürften sowohl die Energieverarmung im Zellstoffwechsel durch Aktivierung der Glykolyse mit ATP-Bildung, als auch schädigende Oxidationsprozesse durch Bereitstellung von NADP^+ aus dem Pentosephosphatweg eingeschränkt werden.

Die Zugabe von Albumin dürfte ein zusätzlicher Schutz der Zellen vor zu hohen freien Fettsäurespiegeln sein. Ähnlich wie im Blut, wo Albumin unspezifisch freie Fettsäuren bindet und sie an zirkulierende Zellen vermittelt (142), soll es auch beim Markieren die freie AA binden und deren Aufnahme in die PMNL erleichtern. In Übereinstimmung damit resultierte bei Reduzierung der Albumin-Menge eine Autostimulation der Zellen, während bei Erhöhung der Einbau radioaktiver AA deutlich vermindert war.

Die Verteilung der radioaktiven AA in den markierten Zellen ist in den einzelnen Arbeiten sehr unterschiedlich. Die eigenen Ergebnisse zeigen einen überwiegenden Einbau in Phospholipide, vor allem in PI (Tab. 5). Eine annähernd gleiche Verteilung beschrieb Walsh (155). Alle anderen Autoren fanden eine weit höhere Markierung der neutralen Lipide, außer Bonser (12) bei Leukämiezellen. Für die PL-Subklassen weichen die Daten ebenfalls erheblich voneinander ab. Für PI reichen die Werte von 15 % bis 64 %, für PC von 18 % bis 51 %. Für PE und PS hingegen stimmen die Angaben ungefähr überein, nur Peters (109) und Tou (152) fanden nach längerem dauern dem Markieren ^3H -AA in PS. Die Abweichungen in der AA-Verteilung könnten durch die Dauer des Markierens (zB 120 min vs 60 min) bedingt sein, wobei eine längere Dauer eine intrazelluläre Umverteilung der AA von PI zu PC zu bewirken scheint. Einen größeren Einfluß auf die Verteilung der AA dürfte deren unterschiedlich hohe Ausgangskonzentration haben. Bei hohen Konzentrationen ($> 0,5 \mu\text{M}$ zB bei: 8, 109, 146) steigt der Anteil der Radioaktivität in den Neutral-Lipiden und in PC. Bei niedrigen Werten ($> 200 \text{ nM}$ zB bei: 155) findet sich in erster Linie in den Phospholipiden bzw. in PI ^3H -AA.

Zu den beschriebenen Abweichungen könnten auch individuelle Eigenschaften einzelner Probanden beitragen, wie zB die Ausprägung enzymatischer Aktivität oder die Ansprechbarkeit auf die angebotene Fettsäure. So ergeben sich bei den eigenen Probanden Unterschiede in der Einbaugeschwindigkeit (Maxima bei 30 bis 60 min), in der Effektivität der Aufnahme und in der Verteilung der $^3\text{H-AA}$. In radioaktiv markierten PMNL fällt eine Besonderheit der AA-Verteilung auf. In allen Veröffentlichungen stimmt das Verhältnis radioaktiv markierter PL nicht mit dem natürlichen Anteil der PL in menschlichen PMNL überein (Tab. 5). Das bedeutet, daß die Markierung in Bezug auf Einbau, Zusammensetzung und Freisetzung von Fettsäuren im PL-Bereich nur ein grobes Modell darstellen kann. Folgerungen aus der Verteilung bzw der Umverteilung der Radioaktivität sollten daher vorsichtig beurteilt werden.

Nach Stimulation des Eikosanoidsystems änderte sich der Gehalt und die Verteilung der Radioaktivität in den zellulären Lipiden. Wesentliche Unterschiede zwischen den einzelnen Stimuli ergaben sich nur in der Menge der freigesetzten $^3\text{H-AA}$, nicht aber in deren Ursprung aus Phospholipid-Subklassen. Die stärkste Reduktion in der PL-Fraktion trat mit -20 % bei A 23187 auf, gegenüber -11 % bei fMLP und -8 % bei SCZ. Der spezifische Einfluß eines Stimulus auf eine PL-Subklasse war nicht erkennbar. Bei allen 3 Stimuli entstammte die AA in erster Linie aus PI und zu geringeren Anteilen aus PC. PE wies immer eine Zunahme auf. Die PS-Fraktion enthielt nur vereinzelt nach fMLP-Stimulation Spuren an Radioaktivität. Bei allen Stimuli war die Freisetzung radioaktiver Substanzen - als $^3\text{H-AA}$ oder als deren $^3\text{H-Metabolite}$ - ins extrazelluläre Medium weitaus geringer, als deren intrazelluläre Umverteilung in die Neutral-Lipide und in PE. Diese Beobachtungen werden durch die Resultate anderer Autoren bestätigt. Die 3 Stimuli weisen somit lediglich in der Menge, nicht aber in der Herkunft der mobilisierten AA größere Unterschiede auf.

Tabelle 5: Natürlicher Anteil der Phospholipide und Verteilung radioaktiv markierter Lipide in PMNL

Autor	Lit.	Lipide		PL-Subklassen			
		PL	NL	PC	PE	PI	PS
Tencé (nicht markier- te Lipide)	149	nb	nb	37%	33%	13%	
Billah	8	39%	61%	38%	15%	46%	nn
Bonser	12	97%	3%	nb.	nb.	nb.	nb.
Peters	109	21%	79%	51%	12%	15%	5%
Stenson	146	43%	57%	nb.	nb.	nb.	nb.
Tou	152	nb.	nb.	50%	18%	27%	5%
Walsh	155	60%	40%	42%	nb.	58%	
Walsh	156	nb.	nb.	18%	10%	34%	
eigene Daten		67%	33%	22%	13%	64%	nn.

Anmerkung: Bei den PL-Subklassen sind die fehlenden Anteile in anderen PL, wie zB. Sphingomyelin, enthalten.
 nb. $\hat{=}$ nicht bestimmt; nn $\hat{=}$ nicht nachweisbar

2.4.3. Stimulation mit A 23187

Das Calcium-Ionophor A 23187 ist ein starker Stimulus der LTB_4 -Synthese in menschlichen neutrophilen Granulozyten. A 23187 führte zu einer raschen Aktivierung der LTB_4 -Synthese, mit einem Maximum bei 2 min. Dies wird auch in den meisten anderen Arbeiten beschrieben (28, 29, 116, 136, 148). Nur Raulf (118) beobachtete das Maximum erst nach 20 min Inkubationsdauer.

Angaben über die Menge des gebildeten LTB_4 pro 1×10^7 PMNL weisen eine sehr große Streubreite auf. Bei den eigenen Proben lag der Mittelwert für 2 min bei 120 ng pro 1×10^7 Zellen (HPLC-Bestimmung), die Extremwerte reichten von 59 ng bis 218 ng. In der Literatur finden sich bei HPLC-Meßung unter vergleichbaren Bedingungen Mittelwerte von minimal 57 ng (147) bis maximal 236 ng (116) pro 1×10^7 PMNL. Neben Meßungenauigkeiten und -unterschieden dürften in erster Linie individuelle und situationsbedingte Eigenschaften der Probanden eine bedeutende Rolle bei der Bestimmung der LTB_4 -Syntheseleistung spielen. So könnten einerseits der Gesundheitszustand des Probanden, die Ausprägung der Enzymaktivitäten oder die Zusammensetzung der Ernährung bedeutende Parameter sein. Andererseits könnten momentane Einflüsse, wie Streß, Erregung, Alkohol- oder Zigarettenkonsum, ebenfalls die LTB_4 -Synthese beeinflussen. Darüber hinaus werden auch Unterschiede in der Präparation, wie zB Dauer und Methode der PMNL-Separation oder der Grad der Zellverunreinigung und Ungenauigkeiten bei der Quantifizierung nach HPLC zu diesen Differenzen beitragen.

In radioaktiv markierten Zellen war die Freisetzung der DiHETE nach 5 min maximal. Ebenso wie bei Shak (136) ließ sich eine rasch einsetzende Metabolisierung und Inaktivierung des LTB_4 zu 20-OH- LTB_4 nachweisen. Da ein beständiges Ansteigen des 20-OH- LTB_4 bei abnehmenden DiHETE-Spiegeln feststellbar war, übertraf die Neusynthese von LTB_4 in den ersten 10 min der Stimulation die Inaktivierung durch ω -Oxidation. Diese Beobachtung wurde auch

in anderen Arbeiten (29, 114, 136, 148) beschrieben, in denen bei längerer Inkubationszeit einerseits eine weitere Zunahme (29, 114), andererseits eine bei 10 min beginnende Verminderung (136) der 20-OH-LTB₄-Konzentration gefunden wurden. Eine weitere Metabolisierung des 20-OH-LTB₄ zu 20-COOH-LTB₄ war in den eigenen Proben nicht feststellbar, ist jedoch aufgrund der Literaturangaben (29, 114, 136) für eine Inkubationsdauer von 20 bis 30 min zu erwarten.

Neben LTB₄ und seinen Metaboliten waren regelmäßig auch freie AA und 5-HETE vorhanden, die quantitativ im Gegensatz zur verminderten DiHETE mit der Länge der Inkubationsdauer anstiegen. In anderen Arbeiten findet sich für LTB₄ (8, 148, 156, 161) und AA (8) aus radioaktiv markierten Zellen ein gleichartiger Verlauf, während für 5-HETE sowohl ein kontinuierlicher Anstieg über 10 min (8, 156), als auch ein Maximum bei 5 min beobachtet wurden (148, 161).

Bei längerer Inkubationsdauer nahmen die 6-trans-Stereoisomere des LTB₄ im Verhältnis zu LTB₄ von knapp 50 % bei 2 min auf 70 % bei 10 min zu; bei 30 min fand Sun (148) ein Mengenverhältnis der Stereoisomere zum LTB₄ von 10:1. Sowohl die Zunahme der LTB₄-Stereoisomere, der 5-HETE und der AA, als auch die Verminderung des LTB₄ zeigen, daß eine Entkopplung der enzymatischen LTB₄-Synthese von der Umsetzung der Eikosanoide bei längerer Inkubationsdauer vorliegt. Während die Aktivität der Phospholipasen und der 5-LO hoch bleibt, angedeutet durch die Zunahme der AA und der 5-HETE, nimmt die Aktivität der LTA₄-Synthetase und der LTA₄-Hydrolase deutlich ab. Dies wird einerseits durch die gesteigerte Reduktion der 5-HPETE zu 5-HETE, wie auch durch die vermehrte nicht-enzymatische Hydrolyse des LTA₄ zu den 6-trans-Stereoisomeren des LTB₄ impliziert. Der Mechanismus, wie diese verminderte LTB₄-Synthese gesteuert wird, kann mit den vorliegenden Ergebnissen nicht näher bestimmt werden. Möglich wären zB eine Produkthemmung der LTA₄-Hydrolase durch LTB₄ oder dessen Abbauprodukte, eine Aktivitätsminderung der Enzyme bei sinkenden intrazellulären

Calcium-Spiegeln oder eine zunehmende Aktivität von Reduktasen bei Anstieg der 5-HPETE. Ein Substratmangel kann bei den steigenden Werten freier AA ausgeschlossen werden.

2.4.4. Stimulation mit fMLP

Das chemotaktische Tripeptid fMLP führte im Vergleich zu A 23187 zu einer geringeren Stimulation der LTB_4 -Synthese. In nicht markierten Proben war bereits zwischen 0,5 und 1 min das Maximum erreicht, bei 10 min trat eine Reduktion um 75 % auf. Ein ähnlicher Verlauf wird auch von Ham (60) beobachtet. Die rasch einsetzende und schnell abnehmende LTB_4 -Synthese könnte bedingen, daß in anderen Arbeiten bei langen Inkubationszeiten von z.B. 15 min (71) oder 25 min (94) kein LTB_4 , sondern nur die ω -Oxidationsprodukte gefunden wurden. Darüber hinaus deutet sich auch eine konzentrationsabhängige Wirkung des fMLP auf PMNL an. So fand Salari (125) bei Stimulation mit 1 μ M fMLP die maximale LTB_4 -Freisetzung erst nach 20 min und De Togni (39) wies die Konzentrationsabhängigkeit für die Bildung von Sauerstoffradikalen, wie auch für die Freisetzung lysosomaler Enzyme nach. Eine geringere fMLP-Konzentration könnte zu einer verminderten Besetzung der Rezeptoren und somit zu einer eingeschränkten Stimulation der Zellen führen. Diesen Zusammenhang konnte De Togni (40) bereits für die durch fMLP induzierte Erhöhung des freien cytosolischen Calciums zeigen.

Nicht markierte PMNL setzten auf fMLP maximal 4,0 ng LTB_4 frei. Dieser Wert wird mit 3,7 ng LTB_4 pro 1×10^7 PMNL von Salari (125) bestätigt, während Werte von 57 ng (94) bzw. 170 ng (60) LTB_4 pro 1×10^7 PMNL nicht nachvollziehbar waren.

Mit diesen Ergebnissen ließ sich sowohl die Mobilisierung endogener AA, als auch die Aktivierung der 5-LO auf Stimulation mit fMLP nachweisen. Somit konnten die Resultate von Clancy (28) und Sun (148) klar widerlegt werden, die auf fMLP zwar die

Aktivierung der 5-L0, nicht aber die Freisetzung von AA beobachteten.

In Versuchen mit radioaktiv markierten PMNL war bereits nach 1 min eindeutig die Bildung von DiHETE feststellbar, das Maximum aber trat erst bei 5 min auf. Die Inaktivierung des LTB_4 setzte, ebenso wie bei A 23187, rasch ein. Da die Maxima für DiHETE und 20-OH- LTB_4 zeitgleich auf 5 min fallen, zeigt sich das sequentielle Auftreten von LTB_4 -Synthese und ω -Oxidation nur im flacheren und späteren Ansteigen des 20-OH- LTB_4 . Dabei wird durch die Zeitverläufe für LTB_4 und 20-OH- LTB_4 - beide nehmen bei 10 min ab - angedeutet, daß Synthese und ω -Oxidation des LTB_4 in äquivalentem Ausmaß auftreten. Ein derartig eng gekoppelter Metabolismus des LTB_4 könnte physiologischen Abläufen sehr gut entsprechen, da die Mediatorfunktion in erster Linie über Konzentrationsänderungen, also über Synthese und Abbau, gesteuert wird. Für eine feine Steuerung der Eikosanoide spricht zusätzlich die Verminderung des 20-OH- LTB_4 nach 10 min Inkubationszeit. Diese Beobachtung steht in Widerspruch zu den eigenen Ergebnissen mit A 23187 und zu Literaturangaben für fMLP, in denen Salari (125) bei spätem LTB_4 -Maximum eine Plateauphase für 20-OH- LTB_4 feststellte und Miller (94) bei 30 min Inkubationsdauer ein prozentuales Überwiegen der ω -Oxidationsprodukte gegenüber LTB_4 berichtete. Eine rasche Inaktivierung des 20-OH- LTB_4 in vivo scheint jedoch aufgrund seiner physiologischen Wirkung - Stimulation der Chemotaxis, der Degranulation, der Ca^{++} -Freisetzung und der Superoxidanionbildung - zur adäquaten Erfüllung der Mediatorfunktion notwendig. Diese Beobachtung und Erklärung wird nicht durch die oben aufgeführten Ergebnisse widerlegt. Bei Stimulation mit A 23187 dürfte wegen der sehr ausgeprägten LTB_4 -Synthese ein Überschuß an Substrat zur ω -Oxidation vorliegen und deshalb der 20-OH- LTB_4 -Spiegel in der Beobachtungszeit nicht abfallen. Die Resultate aus den Literaturangaben lassen sich schlecht verifizieren und mit eigenen Ergebnissen vergleichen. Dazu müßte bei

Salari eine längere Beobachtungsdauer und bei Miller eine deutlichere Darstellung des zeitlichen Verlaufs gefordert werden. Eine fehlende Re-Veresterung des 20-OH-LTB₄ in PL, wie aus den PLA₂-Versuchen und aus der Arbeit von Sun (148) hervorgeht, beweist nicht, daß 20-OH-LTB₄ nicht metabolisiert wird, zumal andere Mechanismen, wie z.B. Einbau in andere Lipide, Abbau über weitere Fettsäureoxidation oder Bindung an freigesetzte Proteine, den Anteil der physiologisch wirksamen Leukotriene reduzieren könnten.

Die 5-HETE zeigte im Gegensatz zu A 23187 initial ein Maximum. Dort erreichte sie aber nur 50 % der Menge des LTB₄ und nahm im weiteren Verlauf der Inkubation stetig ab. Aus eigenen Versuchen (s. PLA₂-Versuche) und aus anderen Veröffentlichungen (12, 146) geht hervor, daß diese Abnahme in erster Linie auf der Re-Veresterung der 5-HETE in zelluläre Phospholipide und Neutral-Lipide beruhen dürfte. Die Menge freier AA nahm nach einem Maximum bei 2 min ebenfalls beständig ab. Die Reduzierung der freien AA und 5-HETE bei gleichzeitigem Ansteigen des LTB₄ und des 20-OH-LTB₄ bis zu 5 min weisen auf eine Ausrichtung des Eikosanoid-Metabolismus auf die LTB₄-Synthese hin. Da im weiteren Verlauf der Stimulation jedoch alle Eikosanoide vermindert auftraten, könnte bei fMLP im Gegensatz zu A 23187 eher eine Reduzierung des Substrat-Angebots die Syntheseleistung begrenzen, weniger eine Abnahme der Enzym-Aktivität.

Ein Vergleich der fMLP-Konzentrationen, die jeweils zur Stimulation zellulärer Reaktionen benötigt wurden (100, 103, 140, 160), deutet auf eine Anpassung des Grades der zellulären Aktivierung an die jeweilige Situation hin. Bei nanomolarer fMLP-Konzentration, entsprechend einer subakuten Gefahr, erfolgt eine Stimulation der Chemotaxis (140) und des Ca⁺⁺-Einstroms (100). Das würde bedeuten, daß die PMNL in eine Art "Alarmbereitschaft" versetzt werden, ohne eine Aktivierung von Abwehrfunktionen.

Bei mikromolaren fMLP-Konzentrationen (140), die eher der Situation einer starken bakteriellen Invasion mit hoher Endotoxin-Konzentration entsprächen, wird eine heftigere Reaktion der PMNL mit LTB_4 -Synthese, Superoxidanionbildung und Degranulation ausgelöst. LTB_4 verstärkt die chemotaktische Wirkung des fMLP und fördert die PMNL-Anreicherung am Entzündungsort, während durch die Degranulation cytotoxische Enzyme freigesetzt und dadurch, ebenso wie mit der Superoxidanionbildung, sowohl Bakterien, als auch körpereigenes Gewebe geschädigt werden. Das würde bedeuten, daß bei niedrigen Endotoxin-Konzentrationen eine "Alarmbereitschaft" der PMNL, bei höheren Konzentrationen eine aggressive Abwehrreaktion ausgelöst werden könnte.

Um diese zellulären Reaktionen auszulösen ist in vitro die Vorinkubation mit Cytochalasin B notwendig. Dessen Wirkungsweise am PMNL ist nicht geklärt. Wechselwirkungen mit Aktin-Filamenten und Anteilen des Cytoskeletts konnten gezeigt, aber deren Rolle noch nicht näher bestimmt werden (1, 88). Die Notwendigkeit der CB-Vorinkubation läßt den Schluß zu, daß die kurze, an den Rezeptor bindende Sequenz des fMLP die bakteriellen Endotoxine nur unvollkommen imitiert und daß für einen vollständigen Ersatz weitere Sequenzen der Endotoxine oder zusätzliche bakterielle Bestandteile benötigt werden.

2.4.5. Stimulation mit SCZ

Auf Stimulation mit SCZ setzte die LTB_4 -Synthese sehr viel langsamer ein, als nach A 23187 oder fMLP. Das Maximum wurde nach flachem Anstieg bei 20 min erreicht. Auch in anderen Arbeiten findet sich die maximale LTB_4 -Synthese erst bei 15 bzw. 30 min Inkubationsdauer (27, 81).

Die Resultate beweisen eindeutig die Stimulation der LTB_4 -Synthese in PMNL durch SCZ, wobei sich SCZ aber als ein schwacher Stimulus in gereinigten Zellen erwies. Die maximale LTB_4 -Menge betrug mit 1,9 ng nur ca. 5 % des Wertes bei A 23187, bzw. ca. 50 % des Wertes bei fMLP. Daher war, ebenso wie bei fMLP der LTB_4 -Nachweis wegen der geringen Menge über HPLC nicht möglich, was bereits bei Sun (148) angedeutet wurde. Die geringe Stimulation der LTB_4 -Synthese durch SCZ wird auch von Salmon (126) beschrieben, der bei SCZ im Vergleich zu A 23187 nur 10 % der Menge an LTB_4 finden konnte. Davon abweichend gibt Claesson (27) an, bei einem Ansatz mit 1×10^9 PMNL 1,7 μg LTB_4 , umgerechnet 17 ng pro 1×10^7 PMNL, erhalten zu haben. Diese Angabe, die auf HPLC-Bestimmung beruht, erscheint im Vergleich mit den anderen Daten als zu hoch, was eventuell auf die Art der Analytik zurückzuführen ist.

Die Stimulation radioaktiv markierter Zellen mit SCZ ergab für die LTB_4 -Synthese die gleiche Zeitabhängigkeit, wie bei nicht markierten PMNL, mit einem Maximum bei 20 min. Bei 2 min ließ sich weder eine Stimulation der 5-LO, noch der AA-Freisetzung finden. Die maximale Menge der ^3H -DiHETE entsprach derjenigen nach fMLP-Stimulation (12008 cpm vs 10883 cpm), blieb aber unter dem Wert für A 23187 (35932 cpm). Eine Parallele zu fMLP-Proben zeigte der gegenüber LTB_4 nur leicht verzögerte Zeitverlauf des 20-OH- LTB_4 . Die Maxima beider Substanzen fielen zusammen. Bei 30 min waren beide deutlich vermindert. Das heißt, daß auch auf SCZ Synthese und Inaktivierung des LTB_4 äquivalent verlaufen und daß ebenso wie bei fMLP ein weiterer Metabolismus des 20-OH- LTB_4 erfolgt.

Im Gegensatz zur mäßigen DiHETE-Synthese setzten die PMNL sehr viel 5-HETE frei. Quantitativ überstieg die 5-HETE die DiHETE um das Zweifache, bzw erreichte die Menge der bei A 23187 freigesetzten 5-HETE. Ein wesentlicher Unterschied der SCZ-Stimulation zu A 23187 oder fMLP liegt für das Auftreten freier AA vor.

Nach SCZ waren stets 69 bis 82 % der Radioaktivität im Überstand freie AA, im Vergleich zu maximal 19 % bei A 23187 bzw. 21 % bei fMLP. Die absolute Menge freier AA nach SCZ war mit 117936 cpm fast 10 mal höher, als die des LTB₄ und war 9 bzw. 20 mal höher, als die Menge freier AA nach Stimulation mit A 23187 (13474 cpm) und fMLP (5107 cpm).

Diese ausgeprägte AA-Freisetzung bei gleichzeitiger Stimulation der LTB₄-Synthese wurde bisher noch nicht beschrieben. Walsh (156) beobachtete zwar die Zunahme freier AA auf SCZ, doch fand er dabei weder eine Stimulation der 5-LO, noch eine quantitative Unterscheidung zur AA-Freisetzung bei Stimulation mit A 23187. Du (42) hingegen wies die Synthese von LTB₄ in radioaktiv markierten PMNL bei 30-minütiger Stimulation mit SCZ nach, machte aber keine Angaben über das Auftreten freier AA. Bei 30 min verringerten sich die freie AA und 5-HETE, was in erster Linie auf einer Wiederaufnahme und Re-Veresterung in zelluläre Lipide beruhen dürfte.

Diese Ergebnisse zeigen, daß bei Stimulation mit SCZ, im Vergleich zu A 23187 oder fMLP, die Freisetzung der AA bei weitem deren Metabolisierung überwiegt. Das heißt, daß die Enzyme der AA-Freisetzung stärker aktiviert sein müssen, als die Enzyme des 5-LO-Weges und somit das große Fettsäureangebot von den Folgeenzymen nicht adäquat verarbeitet werden kann. Zudem scheint die Aktivität der LTA₄-Synthetase gegenüber der der 5-LO geringer zu sein. Von Beginn der Inkubation an ist mehr 5-HETE, als DiHETE vorhanden, die 5-HPETE wird also vor allem über den "Reduktionsshunt" zu 5-HETE metabolisiert, ähnlich wie bei langdauernden A 23187-Inkubationen. Der zweite Hinweis auf eine geringere Enzymaktivierung ergibt sich aus der langen Inkubationszeit, die bis zum Erreichen der maximalen DiHETE-Synthese benötigt wird. Im Vergleich zu fMLP war bei quantitativ gleichwertiger maximaler DiHETE-Synthese bei SCZ die 10-fache Inkubationsdauer erforderlich.

In den radioaktiv markierten Proben konnte wegen der geringen DiHETE-Synthese (unter HPLC-Nachweisgrenze) weder bei fMLP, noch bei SCZ der Anteil der LTB_4 -Stereoisomere naher bestimmt werden. Es fällt jedoch auf, daß in nicht radioaktiven Proben bei fMLP doppelt so viel LTB_4 gebildet wurde, wie bei SCZ. In den radioaktiv markierten Proben hingegen besteht zwischen beiden Stimuli kein Unterschied. Da bei SCZ-Stimulation im Gegensatz zu fMLP Parallelen zu langdauernden A 23187-Stimulationen - zB. geringer LTB_4 -Spiegel, Anstieg der 5-HETE und der AA - bestehen, liegt die Vermutung nahe, daß bei SCZ die LTB_4 -Stereoisomere einen relativ großen Anteil der DiHETE-Fraktion repräsentieren. Dies könnte die oben angeführten Unterschiede zwischen fMLP und SCZ erklären.

Aufzuklären bleibt die Rolle der auf SCZ in großer Menge freigesetzten AA. Eine weitere Verstoffwechselung durch andere Zellen, wie sie Marcus (91) für AA-Metabolite andeutet, stellt eine sehr naheliegende Möglichkeit dar. Dabei könnten zB. in Thrombozyten Thromboxane, in Endothelzellen Prostazyklin, in Makrophagen Prostaglandine und/oder Leukotriene oder in PMNL PAF (platelet activating factor) oder Lipoxine entstehen. Diese Eikanoide könnten weitere Mediatorfunktionen zur Steuerung eines Abwehrprozesses erfüllen.

Der genaue Mechanismus der PMNL-Aktivierung durch SCZ ist nicht bekannt. Eigene Untersuchungen ergaben eine Verminderung des Gehalts an Komplement-Bestandteilen (C_5) im Serum nach Aktivierung des Zymosan. Übereinstimmend mit Yancey (162) und Findlay (45) deutet dies auf eine Rolle des C_5 bei der Aktivierung hin; nach Klebanoff (76) könnten auch C_3 -Fragmente daran beteiligt sein. Diese Komplementbestandteile wären geeignet die beobachteten Effekte des SCZ zu vermitteln, da für sie einerseits Rezeptoren auf den PMNL nachgewiesen wurden (26, 76), andererseits eine Besetzung dieser Rezeptoren in einer Aktivierung der PMNL resultierte (17, 144). Auch die Beobachtung, daß nur aktiviertes, nicht aber einfaches Zymosan die Freisetzung von Eikosanoiden

bewirkt (eigene Versuche und (157, 161)), läßt auf die Beteiligung von Serumbestandteilen bei der Stimulation des Eikosanoidsystems durch SCZ schließen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß erst bei der Aktivierung des Zymosan Mediatoren auftreten, bzw. an das Zymosan gebunden werden, die für die Stimulation essentiell sind.

2.4.6. Vergleich der 3 Stimuli

Stärkster Stimulus der LTB_4 -Synthese war sowohl in radioaktiv markierten, als auch in nicht markierten PMNL das Calcium-Ionophor A 23187, wobei in nicht markierten Proben die Werte der anderen Stimuli um das 10- bzw. 20-fache übertroffen wurden, in radioaktiv markierten Proben um das 3-fache (Abb. 15 - 18). Bei A 23187 und fMLP trat die maximale Aktivierung der LTB_4 - bzw. DiHETE-Synthese in radioaktiv markierten PMNL gegenüber nicht markierten um 3 bis 4 min später auf. Da weder in der Präparation, noch in der Stimulation Unterschiede zwischen diesen Proben bestanden, könnte eine Störung der Zellfunktion durch den Vorgang des Markierens oder bei dessen abschließender Zentrifugation zu der verminderten Ansprechbarkeit der Zellen führen. Mit der üblichen Vitalitätsprüfung - Ausschluß von Trypan-Blau - war zwar lichtmikroskopisch keine Zellschädigung erkennbar, eine Beeinträchtigung des Zell-Stoffwechsels kann aber nicht ausgeschlossen werden. So könnte die verzögerte Aktivierung z.B. durch Verarmung an energiereichen Substraten, durch Mangel an Sauerstoff, durch submikroskopische Strukturveränderungen oder durch Veränderungen der Elektrolyt-Homöostase bewirkt werden. Vor allem eine Verarmung intrazellulärer Ca^{++} -Speicher - die radioaktiv markierten PMNL werden in Ca^{++} -freiem Puffer aufbewahrt - könnte wegen der zentralen Rolle des Ca^{++} bei der Aktivierung der Enzyme die Stimulierbarkeit der Zellen beeinflussen. Da aber SCZ-Stimulationen diesen Verzögerungseffekt nicht

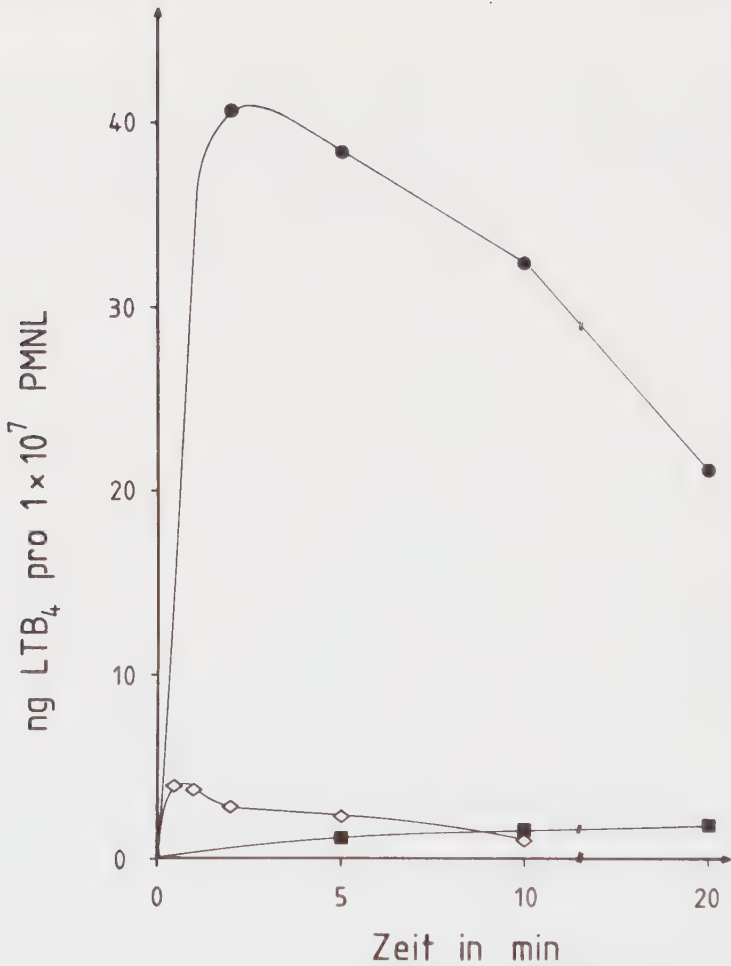


Abb. 15: Einfluß der 3 Stimuli auf die LTB₄-Synthese in nicht radioaktiv markierten PMNL (1×10^7). Die Stimulation erfolgte mit 10 μ M A 23187 (●), 10 μ M fMLP (◇) oder mit 16,7 mg SCZ (■). Dargestellt sind die Mittelwerte (in ng) aus 4 getrennten Versuchen.



Abb. 16: TLC-Auftrennung radioaktiver 5-LO-Produkte nach Stimulation mit 10 μ M A 23187, 16,7 mg SCZ oder mit 10 μ M fMLP. Eine unstimulierte Probe zum Vergleich.
■: Darstellung cochromatographierter Standardsubstanzen

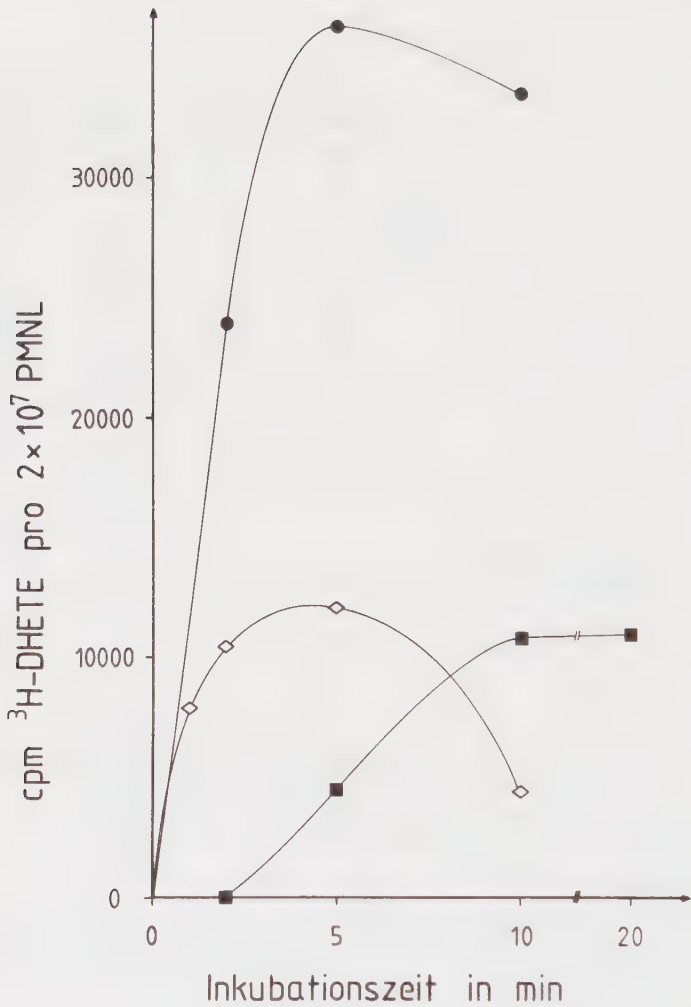


Abb. 17: Einfluß der 3 Stimuli auf die ^3H -DHETE-Synthese in radioaktiv markierten PMNL (2×10^7). Die Stimulation erfolgte mit $10 \mu\text{M}$ A 23187 (●), $10 \mu\text{M}$ fMLP (◇) oder mit $16,7 \text{ mg}$ SCZ (■). Dargestellt sind die Mittelwerte aus 4 getrennten Versuchen.

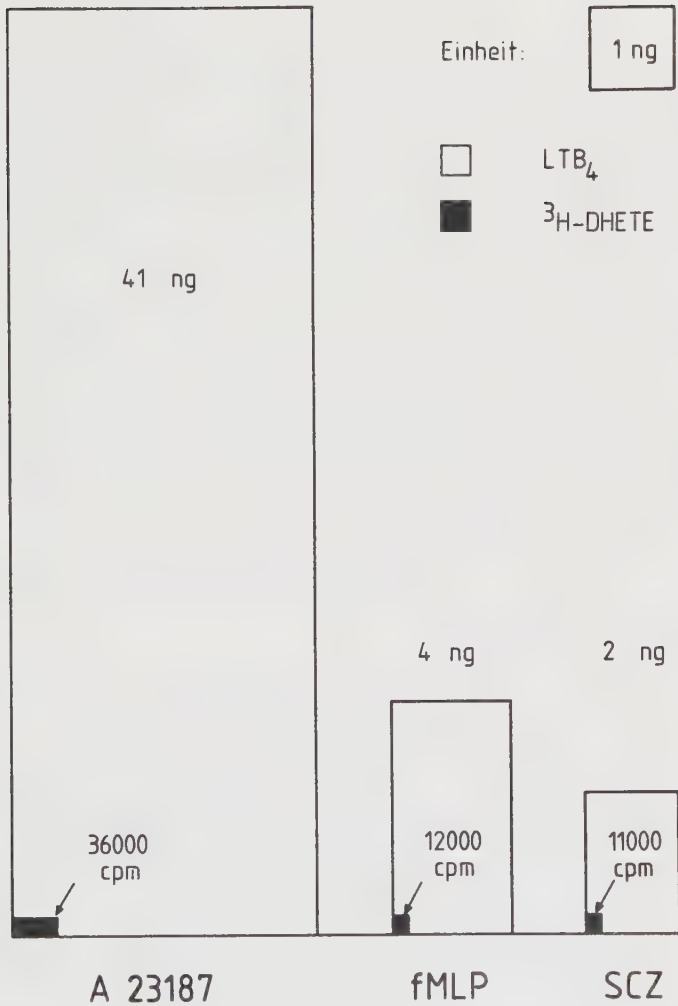


Abb. 18: Gegenüberstellung der LTB₄ bzw. der ³H-DHETE-Synthese in nicht radioaktiv bzw. in radioaktiv markierten PMNL (1×10^7 bzw. 2×10^7) nach Stimulation mit 10 μ M A 23187, 10 μ M fMLP oder 16,7 mg SCZ, jeweils zum Zeitpunkt maximaler Synthese.

zeigten, scheint es vielmehr wahrscheinlich, daß eine länger andauernde Zunahme der nicht-enzymatisch gebildeten LTB_4 -Stereoisomere in radioaktiv markierten Zellen eine Verzögerung des DiHETE-Maximums bewirkt. In Übereinstimmung hiermit ergab die HPLC-Messung von LTB_4 und seinen Stereoisomeren nach A 23187 eine maximale DiHETE-Synthese nach 5 min, während das Maximum für LTB_4 bereits nach 2 min auftrat.

Neben der Verzögerung des LTB_4 -Maximums fällt bei den radioaktiv markierten PMNL auf, daß die Relation der durch die Stimuli bedingten maximalen LTB_4 -Syntheseleistung nicht mit der Relation in nicht markierten Proben übereinstimmt. In nicht markierten Zellen ergibt sich für LTB_4 ein Verhältnis von 20:2:1 für A 23187, fMLP und SCZ. In radioaktiv markierten PMNL aber ist es auf 3:1:1 verringert (Abb. 18). Die leichten Veränderungen zwischen fMLP und SCZ, also die Reduzierung von 2:1 auf 1:1, könnten durch einen höheren Anteil der ^3H - LTB_4 -Stereoisomere bei SCZ erklärt werden (s. 2.4.5.). Auch methodische Einflüsse oder Meßungenauigkeiten könnten dazu beitragen.

Der erheblichen Verminderung des LTB_4 -Anteils in radioaktiv markierten Zellen bei A 23187 dürfte jedoch eine andere Ursache zugrunde liegen. Das Calcium-Ionophor könnte durch den direkten transmembranösen Ca^{++} -Transport eine generalisierte Stimulation des Eikosanoidsystems hervorrufen. Dadurch würden eine generelle AA-Freisetzung und eine hochgradige AA-Umsetzung erfolgen. Wegen der großen Menge nicht markierter AA, die freigesetzt würde, und wegen der begrenzten Menge der ^3H -AA, könnte das auftretende ^3H - LTB_4 die Syntheseleistung nicht mehr adäquat repräsentieren. Das würde bedeuten, daß der Anteil radioaktiver Produkte vermindert und daß daher im Vergleich mit den anderen Stimuli relativ weniger ^3H - LTB_4 nachweisbar wäre.

Für die anderen Stimuli würde dies eine selektive AA-Mobilisierung implizieren. In erster Linie wären davon diejenigen Phospholipide betroffen, die vorher markiert wurden. So könnte z.B.

ein intrazelluläres Phospholipid-System bei einer nicht übermäßigen Aktivierung des Eikosanoidsystems für die Speicherung und Freisetzung der AA eine zentrale Rolle spielen. Bei fMLP und SCZ könnte die Zellaktivierung und LTB_4 -Synthese eher den physiologischen Gegebenheiten angepaßt sein. Da LTB_4 bereits in nanomolaren Konzentrationen wirksam ist, würden die nach fMLP und SCZ erreichten Werte von 12 bzw. 5,5 nM die Erfüllung der Mediatorfunktion gewährleisten. Bei A 23187 hingegen ergäbe sich mit 121 nM eine sehr starke LTB_4 -Bildung, die aus physiologischer Sicht inadäquat wäre. Damit deutet sich eine Einschränkung der physiologischen Relevanz dieses stärksten und am meisten eingesetzten Stimulus der Eikosanoidbildung an.

3. Stimulierbarkeit der LTB₄-Synthese bei Patienten mit pHPT

3.1. Theoretische Grundlagen

Basierend auf den Versuchen zur Stimulierbarkeit der LTB₄-Synthese in PMNL gesunder Probanden, wurde untersucht, inwieweit die LTB₄-Syntheseleistung als Parameter für klinische Anwendungen von Bedeutung sein könnte. Besonders geeignet hierfür schienen Patienten mit pathologischem Calciumstoffwechsel zu sein, da Calcium eine zentrale physiologische Rolle bei der LTB₄-Biosynthese einnimmt. Wie in Abschnitt 2.1.3. bereits genauer ausgeführt, ist ein wesentlicher Schritt der Stimulation neutrophiler Granulozyten die Erhöhung der intrazellulären Ca⁺⁺-Konzentration. Dadurch werden die beiden Schlüsselenzyme des Eikosanoidsystems aktiviert: Phospholipasen (16) für die Freisetzung der AA und die 5-LO (69) für die Synthese von Leukotrienen. Hieraus leitet sich die Fragestellung ab, ob rasch wechselnde Serum-Calcium-Spiegel die LTB₄-Syntheseleistung beeinflussen könnten.

Ein klinisches Modell, das dieser Problemstellung entspricht, repräsentieren Patienten mit primärem Hyperparathyroidismus vor und nach Parathyroidektomie (PTE). Diese Patienten weisen präoperativ erhöhte Ca⁺⁺-Spiegel auf, die postoperativ in wenigen Stunden reduziert und normalisiert werden. Um den Einfluß des operativen Eingriffs auf die LTB₄-Synthese abzuschätzen, wurden in einer Kontrollgruppe Patienten untersucht, die sich bei euthyreoter Stoffwechsellage einer subtotalen Thyroidektomie unterziehen mußten. Beide operativen Verfahren lassen sich in der Schwere des Eingriffs, der Dauer der Narkose und der perioperativen Beeinträchtigung des Patienten gut vergleichen. In der Kontrollgruppe wird jedoch der Ca⁺⁺-Spiegel nur gering verändert.

3.2. Auswahl der Patienten

Folgende Kriterien wurden für die Aufnahme der Patienten in die Studie gewählt. Bei Patienten mit pHPT mußten eindeutig über der Norm liegende Serum- Ca^{++} -Spiegel (im Mittel 6,10 mval/l) und Parathormon-Werte gesichert sein. Darüber hinaus zeigten die meisten Patienten Symptome eines klinisch manifesten pHPT, wie Osteoporose, Nierensteine oder chronische Pankreatitis; andere Ursachen hierfür waren ausgeschlossen. In die Kontrollgruppe wurden nur euthyreote Patienten mit im Normbereich liegenden T_3 - und T_4 -Werten aufgenommen. Sie hatten im Mittel Ca^{++} -Spiegel von 4,48 mval/l. Als Ausschlußkriterium diente das Vorliegen anderer schwerer oder chronischer Erkrankungen, wie zB. manifester Diabetes mellitus, chronische Niereninsuffizienz, chronische gastro-intestinale Erkrankungen oder Malignome. Auch Patienten mit sekundärem HPT, nach Vorbehandlung mit Calcitonin, mit hyperthyreoter Stoffwechsellage oder nach Vorbehandlung mit Thyreostatika wurden nicht in die Studie aufgenommen.

Die histologische Untersuchung der Resektate, bzw. zusätzlich die präoperative szintigraphische Diagnostik, bestätigten in allen Fällen die gestellte Diagnose. Bei pHPT-Patienten fanden sich in 5 Fällen solitäre Adenome und in einem Fall eine diffuse Hyperplasie aller Epithelkörperchen. In der Kontrollgruppe befanden sich 4 diffuse Hyperplasien der Schilddrüse, 2 autonome, kompensierte Adenome und 2 kalte, nicht maligne entartete Knoten.

3.3. Methodik

Beiden Gruppen wurde morgens präoperativ, am 1. postoperativen und am 4. postoperativen Tag Nüchtern-Blut abgenommen. Bei keinem Patienten traten postoperative Komplikationen auf (zB. tiefe Beinvenenthrombose, Narkosezwischenfälle, Lungenembolie, etc.),

abgesehen von hypocalcämischen Symptomen bei pHPT-Patienten. Nach Parathyroidektomie wurde ab dem 2. postoperativen Tag Calcium oral mit 3 x 1000 mg pro Tag substituiert.

Die Inkubationen mit gereinigten PMNL der pHPT-Patienten, wurden, wie unter 2.2.3. beschrieben, durchgeführt. Parallel dazu erfolgte bei beiden Gruppen eine Stimulation der LTB_4 -Synthese in Vollblut-Proben, wie bei Gresele (58) beschrieben. 3 ml heparinisiertes Vollblut wurden mit 10 μ M A 23187 vermischt und für 20 min bei 37° C im Wasserbad inkubiert. Die Inkubation wurde durch rasches Abkühlen in Eiswasser und sofortiger, hoher Zentrifugation beendet. Die Aufbewahrung der Proben bis zur Analyse mit RIA erfolgte bei -20° C.

Die Studie basiert neben Inkubationen gereinigter PMNL vor allem auf Vollblutinkubationen. Diese bieten in Verbindung mit Patienten bedeutende Vorteile, da 1) die Stimulation in einem der Physiologie des Organismus entsprechendem Milieu erfolgt, 2) die PMNL wegen der wegfallenden Zellpräparation weit weniger geschädigt werden und 3) den Patienten eine geringere Blutmenge (3 ml vs 25 ml) abgenommen werden muß. Die Hauptquelle für LTB_4 bleiben die PMNL. Sie besitzen eine annähernd gleiche Syntheseleistung pro Zelle wie Monozyten(56, 87), überwiegen aber anteilsmäßig im peripheren Blut bei weitem (ca. 12:1). Die geringe Zahl eosinophiler Granulozyten bildet sehr wenig LTB_4 pro Zelle (ca. 1/8 der Menge von PMNL; 87). Für Lymphozyten konnte bis jetzt keine 5-LO-Aktivität nachgewiesen werden (87). Sie könnten höchstens über die Freisetzung anderer Mediatoren die LTB_4 -Synthese im Vollblut beeinflussen und dadurch die Relevanz dieser Methode sogar verbessern.

3.4. Ergebnisse

Die Vollblutinkubationen bei pHPT-Patienten ergaben präoperativ im Mittel $1,76 \pm 0,19$ ng LTB_4 pro ml Plasma. Am 1. postoperativen Tag erhöhte sich der Wert vorübergehend auf $2,09 \pm 0,28$ ng (nicht signifikant) und fiel am 4. postoperativen Tag auf $1,25 \pm 0,23$ ng/ml ($p < 0,01$; Abb. 19, 20, Tab. 6). Die Serum- Ca^{++} -Werte verringerten sich von $6,10 \pm 0,62$ mval/l auf $4,28 \pm 0,39$ mval/l am ersten, bzw. auf $4,53 \pm 0,28$ mval/l am 4. postoperativen Tag ($p < 0,01$; Abb. 20, Tab. 6). Die Stimulation gereinigter PMNL zeigte einen Rückgang der LTB_4 -Synthese um 37 % von $91,5 \pm 39,9$ ng pro 1×10^7 PMNL präoperativ auf $58,0 \pm 33,2$ ng am 4. postoperativen Tag ($p < 0,01$), nach einer geringen Zunahme auf $93,8 \pm 44,6$ ng am 1. postoperativen Tag (nicht signifikant; Abb. 21, Tab. 6).

In der Kontrollgruppe enthielten die Vollblutproben präoperativ $0,84 \pm 0,11$ ng LTB_4 pro ml Plasma. Am 1. postoperativen Tag ergab sich gleichfalls ein vorübergehender Anstieg auf $0,97 \pm 0,20$ ng, am 4. postoperativen Tag war mit $0,79 \pm 0,20$ ng ungefähr der Ausgangswert wieder erreicht (Abb. 19 und 20, Tab. 6). Diese Änderungen waren nicht signifikant, ebenso wie die Schwankungen des Ca^{++} -Spiegels, der von $4,48 \pm 0,18$ mval/l präoperativ auf $4,24 \pm 0,21$ mval am 1. postoperativen Tag zurückging und am 4. postoperativen Tag wieder auf $4,51 \pm 0,28$ mval anstieg.

Der statistische Vergleich der LTB_4 -Werte zwischen pHPT-Patienten und der Kontrollgruppe erbrachte, daß die Reduzierung des LTB_4 um $0,51 \pm 0,31$ ng/ml Plasma nach Parathyroidektomie hoch signifikant ($p < 0,01$) gegenüber der geringfügigen Abnahme um $0,05 \pm 0,23$ ng nach subtotaler Thyroidektomie ist (Abb. 22). Die Unterschiede der Ca^{++} -Werte zwischen beiden Gruppen waren nur für die präoperativen Daten hoch signifikant ($p < 0,01$).

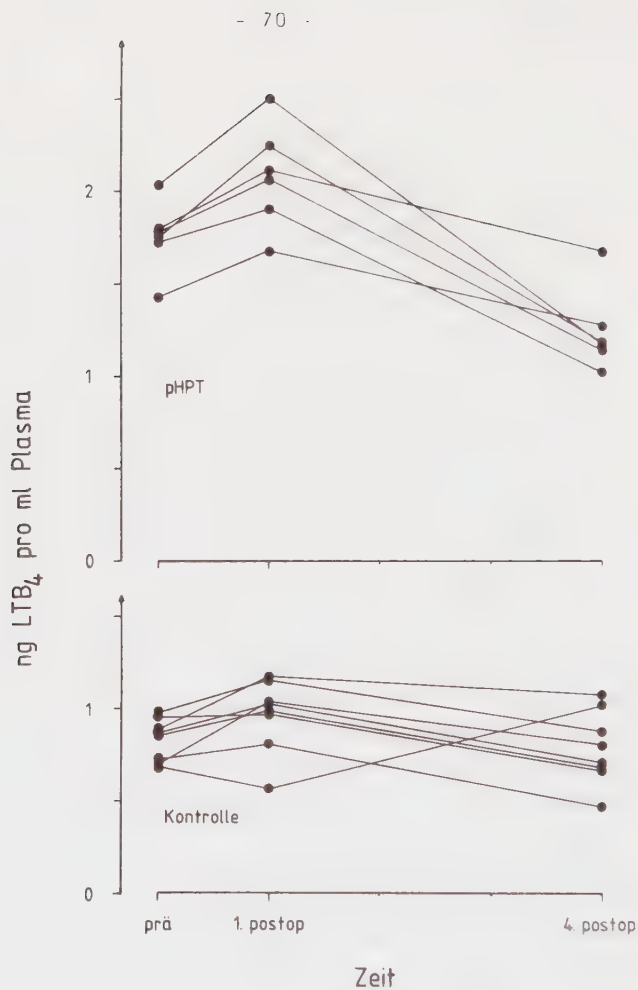


Abb. 19: LTB₄-Synthese (in ng/ml Plasma) in Vollblutproben bei Patienten mit pHPT und in der Kontrollgruppe vor ($\hat{=}$ prä), am 1. Tag ($\hat{=}$ 1. postop) und am 4. Tag ($\hat{=}$ 4. postop) nach der Operation.

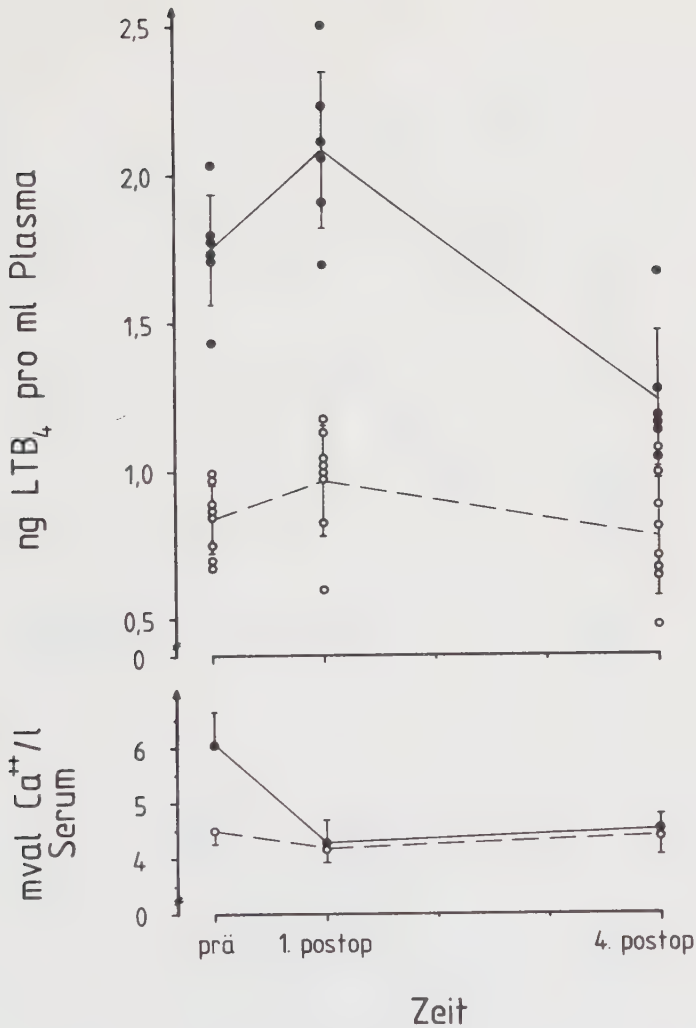


Abb. 20: LTB₄-Synthese in Vollblutinkubationen und mittlere Serum-Ca⁺⁺-Konzentrationen vor ($\hat{=}$ prä), am 1. Tag ($\hat{=}$ 1. postop) und am 4. Tag ($\hat{=}$ 4. postop) nach der Operation. Einzelwerte sind als Punkte (●: pHPT; ○: Kontrollgruppe) dargestellt, die Mittelwerte für LTB₄ als Linien und für Ca⁺⁺ als Punkte mit Standardabweichungen.

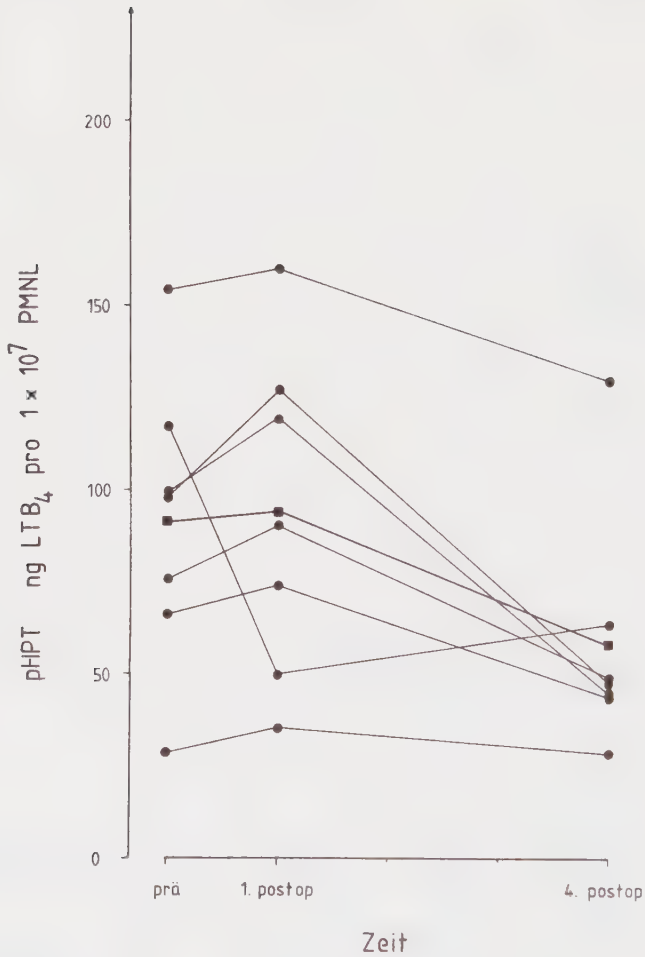


Abb. 21: LTB₄-Synthese in separierten PMNL (1 × 10⁷) vor und nach Parathyroidektomie. Die Punkte repräsentieren Einzelwerte, (■) steht für die Mittelwerte. prä: vor, 1. postop und 4. postop: 1. und 4. Tag nach Operation.

Tabelle 6: Ergebnisse der Stimulationen bei Patienten mit pHPT und in der Kontrollgruppe (KG)

	präoperativ	1. Tag nach OP	4. Tag nach OP
pHPT: LTB_4 in Vollblutinkubationen (ng / ml Plasma)	1,76 $\pm$ 0,19	2,09 $\pm$ 0,28	1,25 $\pm$ 0,23 *
KG: LTB_4 in Vollblutinkubationen (ng / ml Plasma)	0,84 $\pm$ 0,11	0,97 $\pm$ 0,20	0,79 $\pm$ 0,20
pHPT: LTB_4 in PMNL-Inkubationen (ng / 1×10^7 PMNL)	91,5 $\pm$ 39,9	93,8 $\pm$ 44,6	58,0 $\pm$ 33,2 *
pHPT: Ca^{++} -Konzentration im Serum (mval / Liter)	6,10 $\pm$ 0,62	4,28 $\pm$ 0,39 *	4,53 $\pm$ 0,28 *
KG: Ca^{++} -Konzentration im Serum (mval / Liter)	4,48 $\pm$ 0,18	4,24 $\pm$ 0,21	4,51 $\pm$ 0,28

* Hochsignifikante ($p < 0,01$) Veränderung gegenüber dem präoperativen Wert

3.5. Diskussion

Zur Beurteilung der klinischen Relevanz der LTB_4 -Syntheseleistung stellen Patienten mit pHPT ein geeignetes Modell dar. Als denkbarer pathophysiologischer Zusammenhang bietet sich der hierbei veränderte Calcium-Stoffwechsel an, da die Schlüsselenzyme der LTB_4 -Synthese in Abhängigkeit von Ca^{++} aktiviert werden. Ein solcher Zusammenhang sollte in erster Linie bei raschen Veränderungen der Serum- Ca^{++} -Spiegel deutlich werden, wie sie zB nach Parathyroidektomie auftreten. Um Einflüsse, die durch die Operation bedingt sein könnten, zu relativieren, bot sich ein Vergleich mit Patienten an, die bei euthyreoter Stoffwechsellage subtotal thyroidektomiert werden mußten. Da beide operative Verfahren große Ähnlichkeit aufweisen, können die perioperativen Umstände annähernd gleich bewertet werden. Dies bezieht das chirurgische Vorgehen, insbesondere operative Einflüsse, wie Blutverlust, Dauer des Eingriffs, Art und Nebenwirkungen der Narkose, wie auch psychische Belastungen ein. Um Begleiteffekte, die durch geänderte Schilddrüsenhormonspiegel oder Vorbehandlung mit Thyreostatika (zB Granulozytopenie) auftreten könnten, auszuschließen, blieb die Kontrollgruppe auf Patienten mit euthyreoter Stoffwechsellage begrenzt.

Patienten mit pHPT zeigten präoperativ mit 1,76 ng LTB_4 pro ml Plasma Werte, die sowohl gegenüber gesunden, freiwilligen Probanden ($0,95 \pm 0,28$ ng/ml), als auch gegenüber der Kontrollgruppe (0,84 ng/ml) deutlich erhöht waren ($p < 0,01$). Am 4. postoperativen Tag war bei pHPT-Patienten die LTB_4 -Synthese mit 1,25 ng/ml Plasma hoch signifikant ($p < 0,01$) reduziert und erreichte annähernd Normalwerte. In der Kontrollgruppe war postoperativ nur eine minimale Abnahme auf 0,79 ng/ml feststellbar.

In beiden Gruppen trat am 1. postoperativen Tag eine vorübergehende Zunahme des freigesetzten LTB_4 in Vollblutinkubationen

auf. In pHPT-Proben stieg es um 19 % ($\hat{=}$ 0,33 ng/ml) und in der Kontrollgruppe um 15 % ($\hat{=}$ 0,13 ng/ml; Abb. 22). Inkubationen gereinigter PMNL bei pHPT-Patienten ließen in dieser Zeit nur einen minimalen Anstieg um 2 % ($\hat{=}$ 2,28 ng pro 1×10^7 PMNL) erkennen. Bei allen Patienten stiegen zugleich die PMNL im Blut um den Faktor 2 bis 3 an (von im Mittel 3600 PMNL/ μ l präoperativ auf 10000 PMNL/ μ l postoperativ), entsprechend einer reaktiven postoperativen Leukozytose. Diese dürfte in erster Linie zu der höheren LTB₄-Synthese im Vollblut beitragen. Eine gesteigerte Stimulierbarkeit des Eikosanoidsystems liegt nicht vor, da in gereinigten PMNL die LTB₄-Werte fast unverändert waren. Die minimale Erhöhung um 2 % bewegt sich im Streubereich des präoperativen Wertes. Die theoretisch pro PMNL freigesetzte LTB₄-Menge bei Vollblutinkubationen war nach der Operation sogar geringer, als präoperativ (0,21 pg vs 0,35 pg).

Das Serum-Ca⁺⁺ änderte sich am 1. postoperativen Tag gegenläufig zum LTB₄, mit einer hoch signifikanten Reduktion um 30 % ($\hat{=}$ 1,82 mval/l; $p < 0,01$) bei pHPT-Patienten und einer nicht signifikanten Verminderung um 5 % ($\hat{=}$ 0,24 mval/l) in der Kontrollgruppe. Die verminderten Ca⁺⁺-Spiegel dürften kaum zur Erhöhung der LTB₄-Synthese beitragen. Falls dies der Fall wäre, müßten in der Kontrollgruppe die Ca⁺⁺-Werte stärker abfallen und prozentual den Veränderungen bei pHPT-Patienten entsprechen, da in beiden Gruppen die relative Zunahme der LTB₄-Werte fast gleich ist. Die erhöhte LTB₄-Synthese im Vollblut am 1. postoperativen Tag wäre somit als unmittelbare Folge der Operation durch die reaktive Leukozytose erklärbar.

Die annähernde Normalisierung der LTB₄-Werte am 4. postoperativen Tag bei pHPT-Patienten dürfte dagegen kein Begleiteffekt der Operation sein, sondern durch andere Faktoren bedingt werden. Bei pHPT-Patienten nahm die LTB₄-Syntheseleistung in Vollblutinkubationen von präoperativ zum 4. postoperativen Tag hoch signifikant um 29 % ($\hat{=}$ 0,51 ng/ml) ab, während sie in der Kontrollgruppe geringfügig

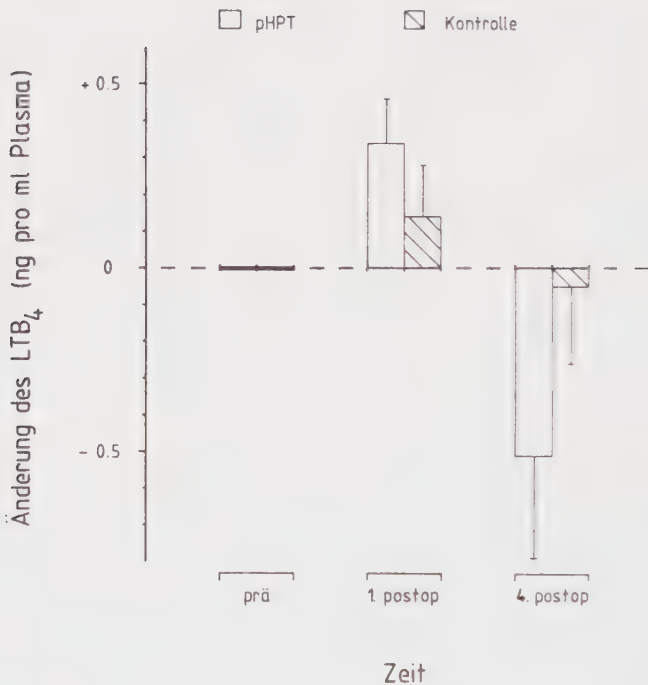


Abb. 22: Postoperative Änderung der LTB₄-Synthese in Vollblutinkubationen bei Patienten mit pHPT und in der Kontrollgruppe (in ng LTB₄/ ml Plasma). Die präoperativen Werte (prä) sind als Basis (= 0) gewählt. 1. postop und 4. postop: 1. und 4. Tag nach Operation.

um 6 % ($\approx 0,05$ ng/ml; Abb. 22) reduziert war. In gereinigten PMNL von pHPT-Patienten verminderte sich die LTB_4 -Synthese sogar um 37 % ($\approx 33,6$ ng pro 1×10^7 PMNL; $p < 0,01$; Abb. 23). Zugleich hatte sich in beiden Gruppen die Leukozytenzahl im Blut auf die präoperativen Werte erniedrigt. Dies kann jedoch nicht die Abnahme der LTB_4 -Syntheseleistung nach PTE erklären, da einerseits auch in gereinigten PMNL der pHPT-Patienten bei konstanter Zellzahl die LTB_4 -Synthese hoch signifikant vermindert war und andererseits in der Kontrollgruppe fast keine Veränderungen auftraten.

Eine mögliche Erklärung für die postoperativ normalisierte LTB_4 -Syntheseleistung bei pHPT-Patienten bietet die Normalisierung des Serum- Ca^{++} . Werden die Werte des 1. postoperativen Tages wegen der reaktiven Leukozytose nicht berücksichtigt, so ergibt sich in beiden Patientengruppen bei Vollblutinkubationen ein annähernd paralleler Verlauf der LTB_4 -Werte und der Ca^{++} -Spiegel (Abb. 24). Bei pHPT-Patienten verringerten sich die mittleren Ca^{++} -Spiegel um 26 % ($\approx 1,57$ mval/l; $p < 0,01$) auf 4,53 mval/l und erreichten die konstanten Werte der Kontrollgruppe. Diese Parallele zum Verlauf des LTB_4 läßt vermuten, daß die Normalisierung des LTB_4 in Zusammenhang mit der Reduzierung des Calcium steht.

Die Versuche mit gereinigten PMNL stellen einen direkten Einfluß des Serum- Ca^{++} -Spiegels auf die LTB_4 -Syntheseleistung jedoch in Frage. Bei diesen Proben kann die Verminderung der LTB_4 -Werte nach PTE nicht auf einer geänderten extrazellulären Ca^{++} -Konzentration beruhen, da diese bei allen Versuchen durch Zugabe von 0,8 mM Ca^{++} zum Inkubationsmedium konstant war. Dieser Beobachtung könnte aber eine verzögerte Anpassung der intrazellulären Ca^{++} -Konzentration an die extrazelluläre Ca^{++} -Konzentration zugrunde liegen, wodurch die Wirkung auf durch Ca^{++} vermittelte intrazelluläre Vorgänge, wie z.B. die LTB_4 -Synthese, verspätet eintreten würde. Calcium wird intrazellulär in speziellen Membransystemen gespeichert (24, 115), wobei der intrazelluläre Ca^{++} -Spiegel über Membranenzyme genau reguliert wird (4, 24). Da die PMNL

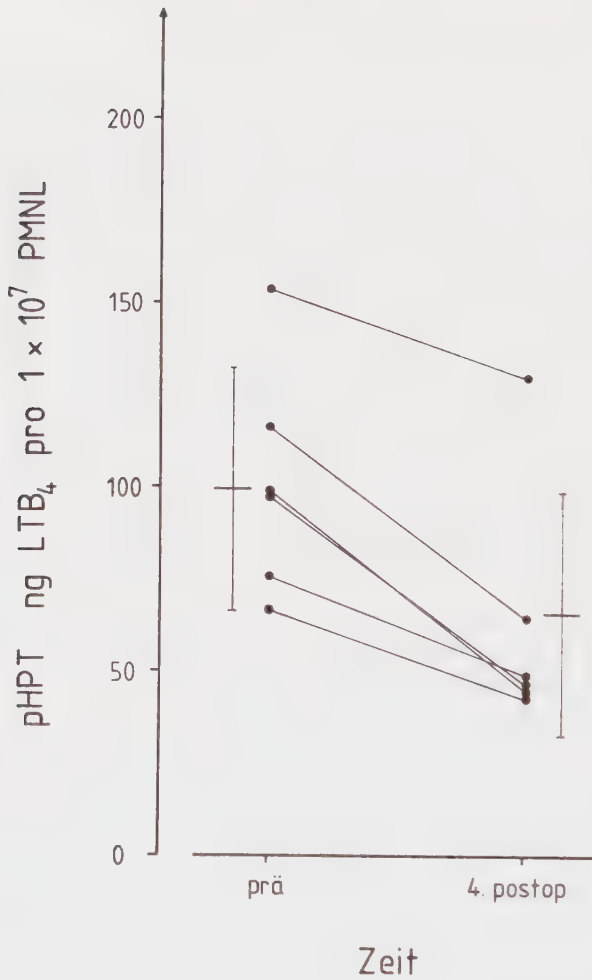


Abb. 23: LTB₄-Synthese in separierten PMNL (1 × 10⁷) vor (≅ prä) und am 4. Tag nach der Operation (≅ 4. postop). Die Einzelwerte sind als Punkte, Mittelwerte als Striche mit Standardabweichungen dargestellt.

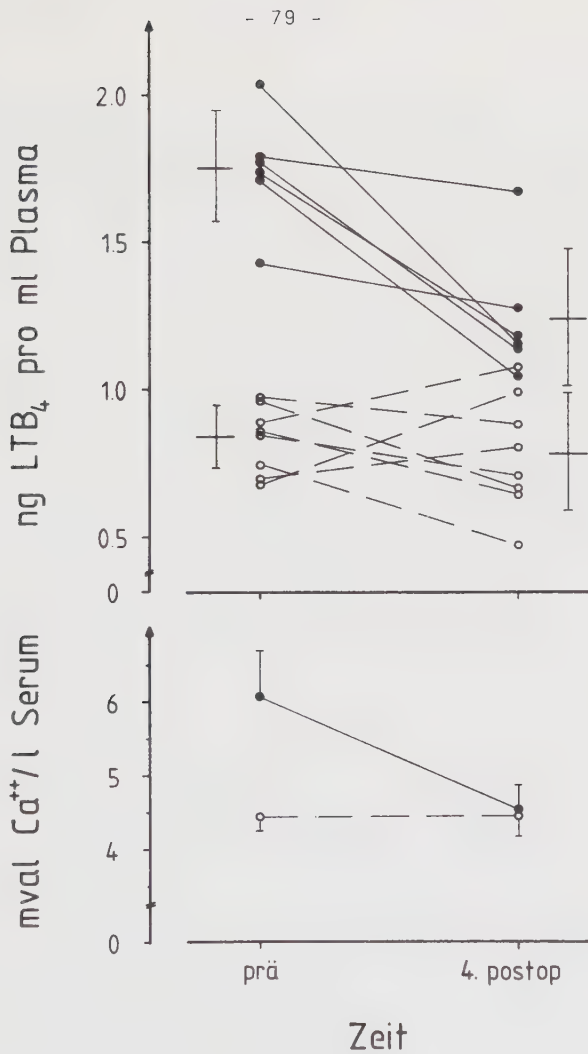


Abb. 24: LTB₄-Synthese in Vollblutinkubationen und mittlere Serum-Ca⁺⁺-Konzentrationen vor ($\hat{=}$ prä) und am 4. Tag nach der Operation ($\hat{=}$ 4. postop). Einzelwerte sind als Punkte (●: pHPT; ○: Kontrollgruppe) dargestellt, die Mittelwerte für LTB₄ als Striche mit Standardabweichungen, für Ca⁺⁺ als Punkte mit Standardabweichungen.

der 1. postoperativen Blutentnahme noch unter den hohen Serum- Ca^{++} -Spiegeln im Knochenmark gereift und womöglich an diese adaptiert waren, könnten sie eine relativ große intrazelluläre Ca^{++} -Reserve aufgewiesen haben, die bei Stimulation zu einer unveränderten LTB_4 -Synthese geführt hätte. Am 4. postoperativen Tag könnte aber bereits eine Anpassung des intrazellulären Calcium an die Serumwerte stattgefunden haben und damit eine Stimulation der Zellen mit einer geringeren Ca^{++} -Freisetzung und dadurch mit einer verminderten Aktivierung der Schlüsselenzyme einhergehen. Diese Annahme einer dissoziierten Änderung intra- und extrazellulärer Ca^{++} -Spiegel nach PTE wird durch die Beobachtung unterstützt, daß bei einigen Patienten Symptome einer Hypocalcämie erst am 2. postoperativen Tag manifest werden.

Die verminderte LTB_4 -Synthese in gereinigten PMNL am 4. postoperativen Tag könnte auch auf der Veränderung anderer endokriner Parameter im Zusammenhang mit der PTE beruhen. So wäre eine Beeinflussung der LTB_4 -Syntheseleistung durch geänderte Parathormon, 1,25-Dihydroxy-Vitamin- D_3 oder Phosphat-Spiegel direkt über eine Interaktion mit den Zellen oder indirekt über die Regulation der Ca^{++} -Homöostase denkbar. Gerade hormonale Einflüsse könnten mit längerer Latenz auf die PMNL einwirken, womit eine Erklärung des verzögerten Absinkens der LTB_4 -Synthese in gereinigten PMNL möglich wäre. Bis jetzt konnte aber bei in vitro Versuchen weder eine direkte Abhängigkeit der LTB_4 -Synthese von diesen Parametern, noch ihre Korrelation zu LTB_4 -Werten gezeigt werden. Ein interessanter klinischer Aspekt ergibt sich aus der möglichen Folge einer erhöhten Stimulierbarkeit der LTB_4 -Synthese bei pHPT-Patienten. Durch geringe exogene oder endogene Reize könnte eine überschießende LTB_4 -Synthese und -Freisetzung in vivo auftreten. Aufgrund der Mediatorfunktion des LTB_4 bei entzündlichen Prozessen könnte dies die Manifestation chronischer Entzündungen, wie Ulcera ventriculi oder duodeni, chronischer Pankreatitiden oder von Gicht - Leiden, die pHPT-Patienten häufiger, als die

Vergleichsbevölkerung aufweisen (110) - erleichtern. Diese Untersuchungen zur LTB_4 -Syntheseleistung bei Patienten mit pHPT ergaben, daß die Bestimmung der LTB_4 -Werte bei klinischen Fragestellungen von Bedeutung sein kann. Dies betrifft sowohl die Bestimmung basaler LTB_4 -Spiegel, als auch die Stimulierbarkeit des Eikosanoidsystems und deren Beeinflussung. Dabei können sich interessante Aspekte pathologischer Befundkonstellationen ergeben, wie zB der oben angesprochene mögliche Zusammenhang hoher LTB_4 -Werte mit dem Auftreten chronischer Entzündungen, oder die Beschreibung einer reduzierten Stimulierbarkeit des Eikosanoidsystems bei Patienten mit Diabetes mellitus (72) mit der dabei beobachteten erhöhten Anfälligkeit für bakterielle Infektionen. Weitere Untersuchungen der pathophysiologischen Zusammenhänge zwischen LTB_4 -Synthese und den Reaktionen im Organismus können helfen diese Befunde richtig zu interpretieren und eine zielgerichtete Beeinflussung der LTB_4 -Syntheseleistung zur kurativen und präventiven Therapie zu erreichen.

4. Zusammenfassung

Die LTB_4 -Synthese in isolierten, menschlichen neutrophilen Granulozyten konnte mit drei, physiologisch unterschiedlich determinierten Stimuli initiiert werden. Die stärkste Aktivierung bewirkte das Calcium-Ionophor A 23187, das zu einem hohen Einstrom extrazellulären Calciums in die Zelle führt. Weitaus geringere stimulatorische Eigenschaften zeigten das chemotaktische Tripeptid fMLP und das, mit Serum aktivierte Polysaccharid Zymosan A (SCZ). Diese Differenzen scheinen in erster Linie auf einem, von A 23187 unterscheidbaren Mechanismus der Zellaktivierung zu beruhen, dem für fMLP und SCZ eine Interaktion mit spezifischen Rezeptoren und konsekutivem, mäßigem Anstieg der intrazellulären Ca^{++} -Konzentration zugrunde liegen dürfte. Dabei könnte das Ausmaß der LTB_4 -Synthese stimulus-spezifisch durch Enzymhemmung, Substratmangel oder geringgradige Enzymaktivierung gesteuert werden.

Eine klinische Studie bei Patienten mit primärem Hyperparathyroidismus ergab eine präoperativ erhöhte LTB_4 -Syntheseleistung, die sich nach Parathyroidektomie normalisierte. Unspezifische operative Einflüsse auf die LTB_4 -Synthese wurden durch Vergleich dieses Patientenkollektivs mit euthyreoten Patienten, die subtotal thyroidektomiert werden mußten, relativiert und ausgeschlossen. Die Resultate lassen eine Abhängigkeit der LTB_4 -Syntheseleistung von Ca^{++} , Parathormon oder anderen damit korrelierten Faktoren, wie $1,25\text{-(OH)}_2$ -Vitamin D_3 oder Phosphat, vermuten. Die klinische Bedeutung der präoperativ erhöhten LTB_4 -Werte, zum Beispiel für die Manifestation von entzündlichen Begleiterkrankungen, muß in weiteren Untersuchungen bestimmt werden.

5. Literaturverzeichnis

- 1 Allison AC, Davies P, De Petris S:
Role of contractile microfilaments in macrophage movement and endocytosis.
Nature, 232: 153 - 155, 1971
- 2 Anderson NE, Allison RD, Meister A:
Interconversion of leukotrienes catalyzed by purified γ -glutamyl-transpeptidase: concomitant formation of leukotriene D₄ and γ -glutamyl amino acids.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 79: 1088 - 1091, 1982
- 3 Atluru D, Goodwin JS:
Control of polyclonal immunoglobulin production from human lymphocytes by leukotrienes; leukotriene B₄ induces OKT8(+), radiosensitive suppressor cell from resting, human OKT8(-) T cells.
J.Clin.Invest., 74: 1444 - 1450, 1984
- 4 Aurbach GD, Marx SJ, Spiegel AM:
In: Williams Textbook of Endocrinology, 6th edition, Eds: Wilson JD and Foster DW, WB Saunders Company, Philadelphia, PA: 922 - 990, 1981
- 5 Bach MK, Brashler JR, Hammarström S, Samuelsson B:
Identification of a component of rat mononuclear cell SRS as leukotriene D.
Biochem.Biophys.Res.Comm., 93: 1121 - 1126, 1980
- 6 Bell RL, Kennerly DA, Stanford N, Majerus PW:
Diglyceride lipase: a pathway for arachidonate release from human platelets.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 76: 3238- 3241, 1979

- 7 Berry HA, Collier HOJ:
Bronchoconstrictor action and antagonism of a slow-reacting substance from anaphylaxis of guinea pig isolated lung.
Brit.J.Pharmacol., 23: 201 - 216, 1964
- 8 Billah MM, Bryant RW, Siegel MI:
Lipoxygenase products of arachidonic acid modulate biosynthesis of platelet-activating factor 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine by human neutrophils via phospholipase A₂.
J.Biol.Chem., 260: 6899 - 6906, 1985
- 9 Bisgaard H, Kristensen J, Sondergaard J:
The effect of leukotriene C₄ and D₄ on cutaneous blood flow in humans.
Prostaglandins, 23: 797 - 801, 1982
- 10 Bligh EG, Dyer WJ:
A rapid method of total lipid extraction and purification.
Can.J.Biochem.Physiol., 37: 911 - 949, 1959
- 11 Bokoch GM, Reed PW:
Effect of various lipoxygenase metabolites of arachidonic acid on degranulation of polymorphonuclear leukocytes.
J.Biol.Chem., 256: 5317 - 5320, 1981
- 12 Bonser RW, Siegel MI, Chung SM, McConnel RT, Cuatrecasas P:
Esterification of an endogenously synthesized lipoxygenase product into granulocyte cellular lipids.
Biochem., 20: 5297 - 5301, 1981

- 13 Borgeat P, Samuelsson B:
Arachidonic acid metabolism in polymorphonuclear leukocytes: effects of ionophore A 23187.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 76: 2148 - 2152, 1979
- 14 Borgeat P, Samuelsson B:
Arachidonic acid metabolism in polymorphonuclear leukocytes: unstable intermediates in formation of dihydroxy acids.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 76: 3213 - 3217, 1979
- 15 Borgeat P, Samuelsson B:
Transformation of arachidonic acid by rabbit polymorphonuclear leukocytes.
J.Biol.Chem., 254: 2643 - 2646, 1979
- 16 vd Bosch, H:
Intracellular phospholipases A₂.
Biochim.Biophys.Acta , 604: 191 - 246, 1980
- 17 Boucek MM, Snyderman R:
Calcium influx requirement for human neutrophil chemotaxis - inhibition by lanthanum chloride.
Science, 193: 905 - 907, 1976
- 18 Boxer LA, Yoder M, Bonsib S, Schmidt M, Ho P, Jersild R, Baehner RL:
Effects of a chemotactic factor, N-formylmethionyl peptide, on adherence, superoxid anion generation, phagocytosis, and microtubule assembly of human polymorphonuclear leukocytes.
J.Lab.Clin.Med., 93: 506 - 514, 1979

- 19 Brain SD, Camp RDR, Kobza Black A, Dowd PM, Greaves MW, Ford-Hutchinson AW, Charleston S:
Leukotrienes C₄ and D₄ in psoriatic skin lesions.
Prostaglandins, 29: 611 - 619, 1985
- 20 Bray MA, Ford-Hutchinson AW, Smith MJH:
Leukotriene B₄: an inflammatory mediator in vivo.
Prostaglandins, 22: 213 - 222, 1981
- 21 Brocklehurst WE:
Occurrence of an unidentified substance during anaphylactic shock in cavy lung.
J.Physiol.(London), 120: 16 P, 1953
- 22 Brocklehurst WE:
The release of histamine and formation of a slow-reacting substance (SRS-A) during anaphylactic shock.
J.Physiol.(London), 151: 416 - 435, 1960
- 23 Camp RDR, Coutts AA, Greaves MW, Kay AB, Walport MJ:
Responses of human skin to intradermal injection of leukotrienes C₄, leukotrienes D₄ and leukotrienes B₄.
J. Invest.Dermatol, 78: 329, 1982
- 24 Carafoli E, Penniston JT:
The calcium signal.
Sci.Amer., 253: 50 - 60, 1985
- 25 Carter SB:
Effects of cytochalasins on mammalian cells.
Nature, 213: 261 - 264, 1967

- 26 Chenoweth DE, Hugli TE:
Demonstration of specific C5a receptor on intact human polymorphonuclear leukocytes.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 75: 3943 - 3947, 1978

- 27 Claesson H-E, Lundberg U, Malmsten C:
Serum-coated zymosan stimulates the synthesis of leukotriene B₄ in human polymorphonuclear leukocytes. Inhibition by cyclic AMP.
Biochem.Biophys.Res.Comm., 99: 1230 - 1237, 1981

- 28 Clancy RM, Dahinden CA, Hugli TE:
Arachidonate metabolism by human polymorphonuclear leukocytes stimulated by N-formyl-Met-Leu-Phe or complement component C5a is independent of phospholipase activation.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 80: 7200 - 7204, 1983

- 29 Clancy RM, Dahinden CA, Hugli TE:
Complement-mediated arachidonate metabolism.
Prog.Biochem.Pharmacol., 20: 120 - 131, 1985

- 30 Cockcroft S, Barrowman MM, Gomperts BD:
Breakdown and synthesis of polyphosphoinositides in fMetLeuPhe-stimulated neutrophils.
FEBS,Lett., 181: 259 - 263, 1985

- 31 Conroy MC, Orange RP, Lichtenstein LM:
Release of slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) from human leukocytes by the calcium ionophore A 23187.
J.Immunol., 116: 1677 - 1681, 1976

- 32 Cramer EB, Pologe L, Pawlowski NA, Cohn ZA, Scott WA:
Leukotriene C promotes prostacyclin synthesis by human endothelial cells.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 80: 4109 - 4113, 1983

- 33 Dahinden CA, Clancy RM, Hugli TE:
Stereospecificity of leukotriene B₄ and structure-function relationships for chemotaxis of human neutrophils.
J.Immunol., 133: 1477 - 1482, 1984
- 34 Dahl M-L:
Aggregating and prostanoid-releasing effects of platelet-activating factor and leukotrienes on human polymorphonuclear leukocytes and platelets.
Int.Arch.Allergy Appl.Immunol., 76: 145 - 150, 1985
- 35 Dahlén S-E, Hedqvist P, Hammarström S, Samuelsson B:
Leukotrienes are potent constrictors of human bronchi.
Nature, 288: 484 - 486, 1980
- 36 Dahlén S-E, Hansson G, Hedqvist P, Björck T, Granström E, Dahlén B:
Allergen challenge of lung tissue from asthmatics elicits bronchial contraction that correlates with the release of leukotrienes C₄, D₄ and E₄.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 80: 1712 - 1716, 1983
- 37 Davis AT, Estenson R, Quie PG:
Cytochalasin B: 3. Inhibition of human polymorphonuclear leukocyte phagocytosis.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 137: 161 - 164, 1971
- 38 Deber CM, Pfeiffer DR:
Ionophore A 23187. Solution conformations of the calcium complex and free acid deduced from proton and carbon-13 nuclear magnetic resonance studies.
Biochem., 15: 132 - 141, 1976

- 39 De Togni P, Bellavite P, Della Bianca V, Grzeskowiak M, Rossi F:
Intensity and kinetics of the respiratory burst of human neutrophils in relation to receptor occupancy and rate of occupation by formylmethionylleucylphenylalanine.
Biochim.Biophys.Acta , 838: 12 - 22, 1985
- 40 De Togni P, Della Bianca V, Grzeskowiak M, Di Virgilio F, Rossi F:
Mechanism of desensitization of neutrophil response to N-formylmethionylleucylphenylalanine by slow rate of receptor occupancy. Studies on changes in Ca^{2+} concentration and phosphatidylinositol turnover.
Biochim.Biophys.Acta , 838: 23 - 31, 1985
- 41 Dougherty RW, Godfrey PP, Hoyle PC, Putney JW jr, Freer RJ:
Secretagogue-induced phosphoinositide metabolism in human leucocytes.
Biochem.J., 222: 307 - 314, 1984
- 42 Du JT, Foegh M, Maddox Y, Ramwell PW:
Human peritoneal macrophages synthesize leukotrienes B_4 and C_4 .
Biochim.Biophys.Acta , 753: 159 - 163, 1983
- 43 Eder M, Gedigk P: (Hrsg)
Lehrbuch der allgemeinen Pathologie und der Pathologischen Anatomie. 30. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: S 358 - 359, 1977
- 44 Feldberg W, Kellaway CH:
Liberation of histamine and formation of lysocithin-like substances by cobra venom.
J.Physiol. (London), 94: 187 - 226, 1938

- 45 Findlay SR, Lichtenstein LM, Grant JA:
Generation of slow reacting substance by human leukocytes.
II. Comparison of stimulation by antigen, anti-IgE, calcium
ionophore and C5-peptide.
J.Immunol., 124: 238 - 242, 1980
- 46 Ford-Hutchinson AW, Bray MA, Doig MV, Shipley ME,
Smith MJH:
Leukotriene B₄, a potent chemokinetic and aggregating
substance released from polymorphonuclear leukocytes.
Nature, 286: 264 - 265, 1980
- 47 Gallin JI, Seligmann BE:
Mobilization and adaptation of human neutrophil chemo-
attractant fMet-Leu-Phe receptors.
Federation Proc., 43: 2732 - 2736, 1984
- 48 Gilliland BG, Rosen H:
Humoral immunity and complement.
In: Clinical Allergy & Immunology, Ed: Altman LC, GK Hall
Med.Publ., Boston, Massachusetts: S. 29 - 36, 1984
- 49 Gimbrone MA jr, Brock AF, Schafer AI:
Leukotriene B₄ stimulates polymorphonuclear leukocyte
adhesion to cultured vascular endothelial cells.
J.Clin.Invest., 74: 1552 - 1555, 1984
- 50 Goetzl EJ:
Mediators of immediate hypersensitivity derived from
arachidonic acid.
N.Engl.J.Med., 303: 822 - 825, 1980

- 51 Goetzl EJ, Pickett WC:
The human leukocyte chemotactic activity of complex
hydroxy-eicosatetraenoic acids (HETEs).
J.Immunol., 125: 1789 - 1791, 1980
- 52 Goetzl EJ:
The conversion of leukotriene C₄ to isomers of leukotriene
B₄ by human eosinophil peroxidase.
Biochem.Biophys.Res.Comm., 106: 270 - 275, 1982
- 53 Goetzl EJ, Payan DG, Goldman DW:
Immunopathogenetic roles of leukotrienes in human diseases.
J.Clin.Immunol., 4: 79 - 84, 1984
- 54 Goldenberg MM, Subers EM:
The reactivity of rat isolated gastrointestinal tissues
to leukotrienes.
Europ.J.Pharmacol., 78: 463 - 466, 1982
- 55 Goldman DW, Goetzl EJ:
Specific binding of leukotriene B₄ to receptors on human
polymorphonuclear leukocytes.
J.Immunol., 129: 1600 - 1604, 1982
- 56 Goldyne ME, Burrish GF, Poubelle P, Borgeat P:
Arachidonic acid metabolism among human mononuclear leukocytes.
J.Biol.Chem., 259: 8815 - 8819, 1984
- 57 Grant JA, Dupree E, Goldman AS, Schultz DR, Jackson AL:
Complement-mediated release of histamine from human leukocytes.
J.Immunol., 114: 1101 - 1106, 1975

- 58 Gresele P, Arnout J, Coene MC, Deckmyn H, Vermylen J:
Leukotriene B₄ production by stimulated whole blood: Comparative studies with isolated polymorphonuclear cells.
Biochem.Biophys.Res.Comm., 137: 334 - 342, 1986
- 59 Greticos PS, Peters SP, Adkinson NF jr, Naclerio RM, Hayes EC, Norman PS, Lichtenstein LM:
Peptide leukotriene release after antigen challenge in patients sensitive to ragweed.
N.Engl.J.Med., 310: 1626 - 1630, 1984
- 60 Ham EA, Soderman DD, Zanetti ME, Dougherty HW, McCauley E, Kuehl FA jr:
Inhibition by prostaglandins of leukotriene B₄ release from activated neutrophils.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 80: 4349 - 4353, 1983
- 61 Hamberg M, Hedqvist P, Radegran K:
Identification of 15-hydroxy-5,8,11,13-eicosatetraenoic acid (15-HETE) as a major metabolite of arachidonic acid in human lung.
Acta Physiol.Scand., 110: 219 - 221, 1980
- 62 Hamel R, Ford-Hutchinson AW:
Bronchoconstrictor effects of leukotriene B₄ in the guinea pig in vivo.
Prostaglandins, 25: 405 - 412, 1983
- 63 Hansson G, Lindgren JA, Dahlén S-E, Hedqvist P, Samuelsson B:
Identification and biological activity of novel ω -oxidized metabolites of leukotriene B₄ from human leukocytes.
FEBS Lett., 130: 107 - 112, 1981

- 64 Hansson G, Malmsten C, Radmark O:
The leukotrienes and other lipoxygenase products.
In: New Comprehensive Biochemistry, Vol. 5; Prosta-
glandins and Related Substances, Eds: Pace Asciak C,
Granström E, Elsevier Science Publishers, Amsterdam:
S. 127 - 164, 1983
- 65 Hirata F, Corcoran BA, Venkatasubramanian K, Schiffmann E,
Axelrod J:
Chemoattractants stimulate degradation of methylated phos-
pholipids and release of arachidonic acid in rabbit leukocytes.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 76: 2640 - 2643, 1979
- 66 Hjorth LF, Jonsson A-K, Vretblad P:
A rapid method for purification of human granulocytes using
Percoll®. A comparison with dextran sedimentation.
J.Immunol.Meth., 43: 95 - 101, 1981
- 67 Ho PPK, Walters CP, Sullivan HR:
A particulate arachidonate lipoxygenase in human blood
platelets.
Biochem.Biophys.Res.Comm., 76: 398 - 405, 1977
- 68 Irvine RF:
How is the level of free arachidonic acid controlled in
mammalian cells?
Biochem.J., 204: 3 - 16, 1982
- 69 Jakschik BA, Sun FF, Lee L, Steinhoff MM:
Calcium stimulation of a novel lipoxygenase.
Biochem.Biophys.Res.Comm., 95: 103 - 110, 1980

- 70 Jakschik BA, Kuo CG:
Characterization of leukotriene A₄ and B₄ biosynthesis.
Prostaglandins, 25: 767 - 781, 1983
- 71 Jubiz W, Radmark O, Malmsten O, Hansson G, Lindgren JA,
Palmlblad J, Udén A-M, Samuelsson B:
A novel leukotriene produced by stimulation of leukocytes
with formylmethionylleucylphenylalanine.
J.Biol.Chem., 257: 6106 - 6110, 1982
- 72 Jubiz W, Draper RE, Gale J, Nolan G:
Decreased leukotriene B₄ synthesis by polymorphonuclear leukocytes from male patients with diabetes mellitus.
Prostagland.Leuk.Med., 14: 305 - 311, 1984
- 73 Kaplan HB, Edelson HS, Friedman R, Weissmann G:
The roles of degranulation and superoxide anion generation in neutrophil aggregation.
Biochim.Biophys.Acta , 721: 55 - 63, 1982
- 74 Kellaway CH, Trethewie ER:
The liberation of slow-reacting smooth muscle-stimulating substance in anaphylaxis.
Quarterly J.Exp.Physiol.(Cogn.Med.Sci.), 30: 121 -145, 1940
- 75 Kito G, Okuda H, Ohkawa S, Terao S, Kikuchi K:
Contractile activities of leukotrienes C₄ and D₄ on vascular strips from rabbits.
Life Science, 29: 1324 - 1332, 1981
- 76 Klebanoff SJ, Beatty PG, Schreiber RD, Ochs HD, Waltersdorff AM:
Effect of antibodies directed against complement receptors on phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes: use of iodination as a convenient measure of phagocytosis.
J.Immunol., 134: 1153 - 1159, 1985

- 77 Klickstein LB, Shapleigh C, Goetzl EJ:
Lipoxygenation of arachidonic acid as a source of polymor-
phonuclear leukocyte chemotactic factors in synovial fluid
and tissue in rheumatoid arthritis and spondylarthritis.
J.Clin.Invest., 66: 1166 - 1170, 1980
- 78 Kragballe K, Voorhees JJ:
Arachidonic acid and leukotrienes in dermatology.
J.Investig.Dermatol., 81: 293 - 296, 1983
- 79 Kreisle RA, Parker CW:
Specific binding of leukotriene B₄ to a receptor on human
polymorphonuclear leukocytes.
J.Exp.Med., 157: 628 - 641, 1983
- 80 Kuo CG, Matthew TL, Jakschik BA:
Leukotriene D₄ and E₄ formation by plasma membrane bound
enzymes.
Prostaglandins, 28: 929 - 938, 1984
- 81 Kurihara A, Ojima F, Tsurufuji S:
Chemotactic factor production by rat polymorphonuclear leu-
kocytes: stimulation with opsonized zymosan particles and
inhibition by dexamethasone.
Biochem.Biophys.Res.Comm., 119: 720 - 725, 1984
- 82 Lee CW, Lewis RA, Corey EJ, Barton A, Ott H, Tauber AI
Austen KF:
Oxidative inactivation of leukotriene C₄ by stimulated human
polymorphonuclear leukocytes.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 79: 4166 - 4170, 1982

- 83 Leffler CW, Mitchell Ja, Green RS:
Cardiovascular effects of leukotrienes in neonatal piglets.
Role in hypoxic pulmonary vasoconstriction?
Circul.Res., 55: 780 - 787, 1984
- 84 Leitch AG, Austen KF, Corey EJ, Drazen JM:
Effects of indomethacin on the guinea-pig pulmonary response
to intravenous leukotrienes C₄ and D₄.
Clin.Sci., 65: 281 - 287, 1983
- 85 Leitch AG:
Leukotrienes and the lung.
Clin.Sci., 67: 153 - 160, 1984
- 86 Lew PD, Dayer J-M, Wollheim CB, Pozzan T:
Effect of leukotriene B₄, prostaglandin E₂ and arachidonic
acid on cytosolic-free calcium in human neutrophils.
FEBS Lett., 166: 44 - 48, 1984
- 87 Lewis RA, Austen KF:
The biologically active leukotrienes.
J.Clin.Invest., 73: 889 - 897, 1984
- 88 Lin DC, Lin S:
High affinity binding of [³H] dihydrocytochalasin B to peri-
pheral membrane proteins related to the control of cell
shape in the human red cell.
J.Biol.Chem., 253: 1415 - 1419, 1978
- 89 Löffler G, Petrides PE, Weiss L, Harper HA:
Physiologische Chemie.
2.Aufl. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York:
S. 714 - 715, 1979

- 90 Lundberg U, Radmark O, Malmsten C, Samuelsson B:
Transformation of 15-hydroperoxy-5,9,11,13-eicosatetraenoic
acid into novel leukotrienes.
FEBS Letters, 126: 127 - 132, 1981
- 91 Marcus AJ, Brockman MJ, Safier LB, Ullman HL, Islam N:
Formation of leukotrienes and other hydroxy acids during
platelet-neutrophil interactions in vitro.
Biochem.Biophys.Res.Comm., 109: 130 - 137, 1982
- 92 Mathews WR, Rokach J, Murphy RC:
Analysis of leukotrienes by high-pressure liquid chromato-
graphy.
Anal.Biochem., 118: 96 - 101, 1981
- 93 Matthay MA, Eschenbacher WL, Goetzl EJ:
Elevated concentrations of leukotriene D₄ in pulmonary edema
fluid of patients with adult respiratory distress syndrome.
J.Clin.Immunol., 4: 479 - 483, 1984
- 94 Miller DK, Sadowski S, Soderman DD, Kuehl FA jr:
Endothelial cell prostacyclin production induced by activated
neutrophils.
J.Biol.Chem., 260: 1006 - 1014, 1985
- 95 Morris HR, Taylor GW, Piper PJ, Sirois P, Tippins JR:
Slow-reacting substance of anaphylaxis. Purification and
characterization.
FEBS Lett., 87: 203 - 206, 1978
- 96 Muccitelli RM, Osborn RR, Weichman BM:
Effect of inhibition of thromboxane production on the leu-
kotriene C₄-mediated bronchoconstriction in the guinea pig.
Prostaglandins, 26: 197 - 206, 1983

- 97 Murphy RC, Hammarström S, Samuelsson B:
A slow reacting substance from murine mastocytoma cells.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 76: 4275 - 4279, 1979
- 98 Naccache PH, Showell HJ, Becker EL, Sha'afi RI:
Changes in ionic movements across rabbit polymorphonuclear
leukocyte membranes during lysosomal enzyme release.
J.Cell.Biol., 75: 635 - 649, 1977
- 99 Naccache PH, Molski TFP, Borgeat P, White JR, Sha'afi RI:
Phorbol esters inhibit the fMet-Leu-Phe- and leukotriene B₄-
stimulated calcium mobilization and enzyme secretion in
rabbit neutrophils.
J.Biol.Chem., 260: 2125 - 2131, 1985
- 100 Nakagawara M, Takeshige K, Sumimoto H, Yoshitake J,
Minakami S:
Superoxide release and intracellular free calcium of calcium-
depleted human neutrophils stimulated by N-formyl-Methionyl-
Leucyl-Phenylalanine.
Biochim.Biophys.Acta , 805: 97 - 103, 1984
- 101 Niedel J, Wilkinson S, Cuatrecasas P:
Receptor-mediated uptake and degradation of ¹²⁵I-chemotactic
peptide by human neutrophils.
J.Biol.Chem., 254: 10700 - 10706, 1979
- 102 Nugteren DH:
Arachidonate lipxygenase in blood platelets.
Biochim.Biophys.Acta , 380: 299 - 307, 1975
- 103 Painter RG, Sklar LA, Jesaitis AJ, Schmitt M, Cochrane CG:
Activation of neutrophils by N-formyl chemotactic peptides.
Fed.Proc., 43: 2737 - 2741, 1984

- 104 Palmlblad J, Malmsten CL, Udén A-M, Radmark O, Engstedt L, Samuelsson B:
Leukotriene B₄ is a potent and stereospecific stimulator of neutrophil chemotaxis and adherence.
Blood, 58: 658 - 661, 1981
- 105 Palmlblad J, Udén A-M, Lindgren J-A, Radmark O, Hansson G, Malmsten CL:
Effects of novel leukotrienes on neutrophil migration.
FEBS Lett., 144: 81 - 84, 1982
- 106 Parker CW, Aykent S:
Calcium stimulation of the 5-lipoxygenase from RBL-1 cells.
Biochem.Biophys.Res.Comm., 109: 1011 - 1016, 1982
- 107 Payan DG, Goetzl EJ:
Specific suppression of human T-lymphocyte function by leukotriene B₄.
J.Immunol., 131: 551 - 553, 1983
- 108 Perez HD, Ong RR, Elfman F:
Removal or oxidation of surface membrane sialic acid inhibits formyl-peptide-induced polymorphonuclear leukocyte chemotaxis.
J.Immunol., 134: 1902 - 1908, 1985
- 109 Peters SP, Mac Glashan DW jr, Schulman ES, Schleimer RP, Hayes EC, Rokach J, Adkinson NF jr, Lichtenstein LM:
Arachidonic acid metabolism in purified human lung mast cells.
J.Immunol., 132: 1972 -1979, 1984
- 110 Petersdorf RG, Adams RD, Braunwald E, Isselbacher KJ, Martin JB, Wilson JD (Eds):
Harrison's Principles of Internal Medicine, 10th Ed.
Mc Graw Hill Int Book Company, 1983

- 111 Pfeffer MA, Pfeffer JM, Lewis RA, Braunwald E, Corey EJ, Austen KF:
Systemic hemodynamic effects of leukotrienes C₄ and D₄ in the rat.
American J.Physiol., 244: H 628 - H 633, 1983
- 112 Pfeiffer DR, Lardy HA:
Ionophore A 23187. The effect of H⁺ concentration on complex formation with divalent and monovalent cations and the demonstration of K⁺ transport in mitochondria mediated by A 23187. Biochem., 15: 935 - 943, 1976
- 113 Pologe LG, Cramer EB, Pawlowski NA, Abraham E, Cohn ZA, Scott WA:
Stimulation of human endothelial cell prostacyclin synthesis by select leukotrienes.
J.Exp.Med., 160: 1043 - 1053, 1984
- 114 Powell WS:
Properties of leukotriene B₄ 20-hydroxylase from polymorphonuclear leukocytes.
J.Biol.Chem., 259: 3082 - 3089, 1984
- 115 Prentki M, Wollheim CB, Lew PD:
Ca²⁺ homeostasis in permeabilized human neutrophils.
J.Biol.Chem., 259: 13777 - 12782, 1984
- 116 Prescott SM:
The effect of eicosapentaenoic acid on leukotriene B production by human neutrophils.
J.Biol.Chem., 259: 7615 - 7621, 1984
- 117 Rae SA, Davidson EM, Smith MJH:
Leukotriene B₄, an inflammatory mediator in gout.
Lancet, ii : 1122 - 1123, 1982

- 118 Raulf M, Stüning M, König W:
Metabolism of leukotrienes by L- γ -glutamyl-transpeptidase
and dipeptidase from human polymorphonuclear granulocytes.
Immunology, 55: 135 - 147, 1985
- 119 Redl H, Hammerschmidt DE, Schlag G:
Augmentation by platelets of granulocyte aggregation in
response to chemotaxins: studies utilizing an improved cell
preparation technique.
Blood, 61: 125 - 131, 1983
- 120 Ringertz B, Palmlblad J, Radmark O, Malmsten C:
Leukotriene-induced neutrophil aggregation in vitro.
FEBS Lett., 147: 180 - 182, 1982
- 121 Rola-Pleszczynski M, Gagnon L, Sirois P:
Leukotriene B₄ augments human natural cytotoxic cell activity.
Biochem.Biophys.Res.Comm., 113: 531 - 537, 1983
- 122 Romeo D, Zabucchi G, Miani N, Rossi F:
Ion movement across leukocyte plasma-membrane and excitation
of their metabolism.
Nature, 253: 542 - 544, 1975
- 123 Rosen H:
Neutrophil function and dysfunction.
In: Clinical Allergy & Immunology, Ed: Altman LC, GK Hall
Medical Publishers, Boston, Massachusetts: S. 79 - 108, 1984
- 124 Salari H, Braquet P, Borgeat P:
Comparative effects of indomethacin, acetylenic acids,
15-HETE, nordihydroguaiaretic acid and BW 755c on the meta-
bolism of arachidonic acid in human leukocytes and platelets.
Prostaglandins, Leukotrienes, Med., 13: 53 - 60

- 125 Salari H, Braquet P, Naccache P, Borgeat P:
Characterization of effect of N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine on leukotriene synthesis in human polymorphonuclear leukocytes.
Inflammation, 9: 127 - 138, 1985
- 126 Salmon JA, Tilling LC, Moncada S:
Evaluation of inhibitors of eicosanoid synthesis in leukocytes: possible pitfall of using the calcium ionophore A 23187 to stimulate 5-lipoxygenase.
Prostaglandins, 29: 377- 385, 1985
- 127 Samuelsson B, Borgeat P, Hammarström S, Murphy RC:
Introduction of a nomenclature: leukotrienes.
Prostaglandins, 17: 785 - 787, 1979
- 128 Samuelsson B, Hammarström S, Murphy RC, Borgeat P:
Leukotrienes and slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A).
Allergy, 35: 375 - 381, 1980
- 129 Samuelsson B:
Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation.
Science, 220: 568 - 575, 1983
- 130 Schell-Frederick E:
Stimulation of oxidative metabolism of polymorphonuclear leukocytes by calcium ionophore A 23187.
FEBS Lett., 48: 37 - 40, 1974
- 131 Schild HO, Hawkins DF, Mongar JL, Herzeimer H:
Reactions of isolated human asthmatic lung and bronchial tissue to specific antigen.
Lancet, ii : 376 - 382, 1951

- 132 Schmidt RF, Thews G (Hrsg):
Physiologie des Menschen.
20.Aufl., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York:
374 - 375, 1980
- 133 Seligmann BE, Chused TM, Gallin JI:
Human neutrophil heterogeneity identified using flow micro-
fluorometry to monitor membrane potential.
J.Clin.Invest., 68: 1125 - 1131, 1981
- 134 Serhan CN, Broekman MJ, Korchak HM, Marcus AJ, Weissmann G:
Endogenous phospholipid metabolism in stimulated neutro-
phils, differential activation by fMLP and PMA.
Biochem.Biophys.Res.Comm., 107: 951 - 958, 1982
- 135 Serhan CN, Radin A, Smolen JE, Korchak H, Samuelsson B,
Weissmann G:
Leukotriene B₄ is a complete secretagogue in human neutro-
phils: a kinetic analysis.
Biochem.Biophys.Res.Comm., 107: 1006 - 1012, 1982
- 136 Shak S, Goldstein IM:
 ω -oxidation is the major pathway for the catabolism of
leukotriene B₄ in human polymorphonuclear leukocytes.
J.Biol.Chem., 259: 10181 - 10187, 1984
- 137 Sirois P, K  rouac R, Roy S, Borgeat P, Picard S, Rioux F:
In vivo effects of leukotriene B₄, C₄ and D₄. Evidence that
changes in blood pressure are mediated by prostaglandins.
Prostaglandins Med., 7: 363 - 373, 1981

- 138 Skipski VP, Peterson RF, Barclay M:
Quantitative analysis of phospholipids by thin-layer
chromatography.
Biochem.J., 90: 374 - 378, 1964
- 139 Smith RJ, Ignarro LJ:
Bioregulation of lysosomal enzyme-secretion from human
neutrophils - roles of guanosine 3'-5'-monophosphate and
calcium in stimulus-secretion coupling.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 72: 108 - 112, 1975
- 140 Snyderman R:
Regulatory mechanisms of a chemoattractant receptor on
leukocytes.
Fed.Proc., 43: 2743 - 2748, 1984
- 141 Soter NA, Lewis RA, Corey EJ, Austen KF:
Local effects of synthetic leukotrienes (LTC₄, LTD₄, LTE₄
and LTB₄) in human skin.
J.Invest.Dermatol., 80: 115 - 119, 1983
- 142 Spector AA:
Plasma lipid transport.
Clin.Physiol.Biochem., 2: 123 - 134, 1984
- 143 Spooner BS, Wessels NK:
Effects of cytochalasin B upon microfilaments involved in
morphogenesis of salivary epithelium.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 66: 360 - 364, 1970
- 144 Stapleton CL, Barnard RM, Chandler DE:
Intracellular or extracellular calcium can be used to trigger
C5a-stimulated enzyme secretion from rabbit neutrophils.
Biochim.Biophys.Acta , 763: 225 - 230, 1983

- 145 Stenmark KR, James SL, Voelkel NF, Toews WH, Reeves JT, Murphy RC:
Leukotriene C₄ and D₄ in neonates with hypoxemia and pulmonary hypertension.
N.Engl.J.Med., 309: 77 - 80, 1983
- 146 Stenson WF, Parker CW:
Metabolism of arachidonic acid in ionophore-stimulated neutrophils.
J.Clin.Invest., 64: 1457 - 1465, 1979
- 147 Strasser T, Fischer S, Weber PC:
Inhibition of leukotriene B₄ formation in human neutrophils after oral nafazatrom (Bay G 6575).
Biochem.Pharmacol., 34: 1891 - 1894, 1985
- 148 Sun FF, Mc Guire JC:
Metabolism of arachidonic acid by human neutrophils. Characterization of the enzymatic reactions that lead to the synthesis of leukotriene B₄.
Biochim.Biophys.Acta , 794: 56 - 64, 1984
- 149 Tencé M, Jouvin-Marché E, Bessou G, Record M, Benveniste J:
Ether-phospholipid composition in neutrophils and platelets. Thromb.Res., 38: 207 - 214, 1985
- 150 Terashita Z-I, Fukui H, Hirata M, Terao S, Ohkawa S, Nishikawa K, Kikuchi S:
Coronary vasoconstriction and PGI₂ release by leukotrienes in isolated guinea pig heart.
Europ.J.Pharmacol., 73: 357 - 361, 1981

- 151 Tonnesen MG, Smedly LA, Henson PM:
Neutrophil-endothelial cell interactions. Modulation of
neutrophil adhesiveness induced by complement fragments C5a
and C5a des arg and formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine
in vitro.
J.Clin.Invest., 74: 1581 - 1592, 1984
- 152 Tou J-S:
Incorporation of arachidonic acid and eicosapentaenoic acid
into phospholipids by polymorphonuclear leukocytes in vitro.
Lipids, 19: 573 - 577, 1984
- 153 Vanderhoek JY, Bryant RW, Bailey JM:
15-Hydroxy-5,8,11,13-eicosatetraenoic acid: a potent and
selective inhibitor of platelet lipooxygenase.
J.Biol.Chem., 255: 5996 - 5998, 1980
- 154 Volpi M, Naccache PH, Sha'afi RI:
Arachidonate metabolite(s) increase the permeability of
the plasma membrane of the neutrophils to calcium.
Biochem.Biophys.Res.Comm., 92: 1231 - 1237, 1980
- 155 Walsh CE, Waite BM, Thomas MJ, DeChatelet LR:
Release and metabolism of arachidonic acid in human neutro-
phils.
J.Biol.Chem., 256: 7228 - 7234, 1981
- 156 Walsh CE, DeChatelet LR, Chilton FH, Wykle RL, Waite BM:
Mechanism of arachidonic acid release in human polymor-
phonuclear leukocytes.
Biochim.Biophys.Acta, 750: 32 - 40, 1983

- 157 Weissmann G, Zurier RB, Spieler PJ, Goldstein IM:
Mechanisms of lysosomal enzyme release from leukocytes
to immune complexes and other particles.
J.Exptl.Med., 134: 149s - 165s, 1971
- 158 Weller PF, Lee CW, Foster DW, Corey EJ, Austen KF, Lewis RA:
Generation and metabolism of 5-lipoxygenase pathway leuko-
trienes by human eosinophils: predominant production of
leukotriene C₄.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 80: 7626 - 7630, 1983
- 159 Wessells NK, Spooner BS, Ash JF, Bradley MO, Luduena MA,
Taylor EL, Wrenn JT, Yamada KM:
Microfilaments in cellular and developmental processes.
Science, 171: 135 - 143, 1971
- 160 White JR, Naccache PH, Molski TFP, Borgeat P, Sha'afi RI:
Direct demonstration of increased intracellular concentra-
tion of free calcium in rabbit and human neutrophils
following stimulation by chemotactic factor.
Biochem.Biophys.Res.Comm., 113: 44 - 50, 1983
- 161 Williams JD, Lee TH, Lewis RA, Austen KF:
Intracellular retention of the 5-lipoxygenase pathway
product, leukotriene B₄, by human neutrophils activated
with unopsonized zymosan.
J.Immunol., 134: 2624 - 2630, 1985
- 162 Yancey KB, Hammer CH, Harvath L, Renfer L, Frank MM,
Lawley TJ:
Studies on human C5a as a mediator of inflammation in
normal human skin.
J.Clin.Invest., 75: 486 - 495, 1985

- 163 Yusko P, Hall RA, Ford-Hutchinson AW:
Contraction of guinea pig gall bladder strips by leuko-
trienes and other agonists.
Prostaglandins, 25: 397 - 403, 1983
- 164 Zabucchi G, Soranzo MR, Rossi F, Romeo D:
Exocytosis in human polymorphonuclear leukocytes induced
by A 23187 and calcium.
FEBS Lett., 54: 44 - 48, 1975

Mein besonderer Dank gilt:

allen Patienten und Probanden für die bereitwillige Teilnahme an der Studie bzw. an den Basis-Versuchen;

Herrn Prof. Dr. med. P.C. Weber für die Überlassung des Themas, die wertvollen Anregungen und die Korrektur der Arbeit;

Herrn Prof. Dr. Dr. med. F. Spelsberg für die hilfreiche Beratung und die freundliche Erlaubnis die klinische Studie im Krankenhaus Martha-Maria, München-Solln, durchzuführen;

den Mitarbeitern des Labors von Herrn Prof. Dr. Weber, insbesondere Herrn Th. Strasser für die Unterstützung und Planung beider Teile der Arbeit und Frau B. Böhlig für die technische Hilfeleistung;

Herrn Prof. Dr. med. E. Buchborn für die vielseitigen Arbeitsmöglichkeiten innerhalb der Medizinischen Klinik Innenstadt.

Lebenslauf

Am 17.02.1961 wurde ich als Sohn des Maschinenbauingenieurs Alois Sellmayer und seiner Frau Susanne Sellmayer, geborene Schweikhardt, in München geboren.

Nach der Einschulung in die Grundschule Schäftlarn im Jahr 1967 trat ich 1971 auf das Gymnasium Icking über, wo ich im Juni 1980 die Abiturprüfung bestand.

Von Juli 1980 bis Mai 1981 leistete ich 10 Monate meines Grundwehrdienstes ab, von dem ich nach Erhalt eines Studienplatzes für Humanmedizin für die Restdienstzeit zurückgestellt wurde.

Im Sommersemester 1981 begann ich das Medizinstudium an der Ludwig Maximilians-Universität in München. Ohne den Studienort zu wechseln, schloß ich dort im April 1987 mein Medizinstudium mit dem 3. Teil des Staatsexamens ab und wurde als Arzt approbiert.

